



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0047274  
(43) 공개일자 2012년05월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7005103  
(22) 출원일자(국제) 2010년07월29일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2012년02월27일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/043716  
(87) 국제공개번호 WO 2011/014659  
국제공개일자 2011년02월03일  
(30) 우선권주장  
61/229,586 2009년07월29일 미국(US)  
61/252,790 2009년10월19일 미국(US)

- (71) 출원인  
아보트 러보러터리즈  
미국 일리노이주 60064-6008 아보트 파크 아보트  
파크 로드 100 디파트먼트 377 빌딩 에이피6  
에이-1  
(72) 발명자  
가유르 타리크  
미국 매사추세츠주 01746 홀리스톤 워싱턴 스트리트 1014  
리우 준지안  
미국 매사추세츠주 01545 슈루즈버리 크립슨 드라이브 14  
이브라기모브 알렉산더  
미국 매사추세츠주 01772 사우스버러 블렌던 우즈  
드라이브 3  
(74) 대리인  
장훈

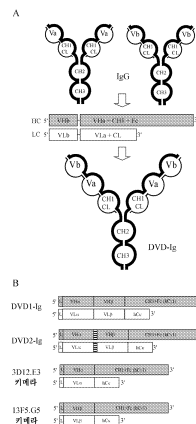
전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 이원 가변 도메인 면역글로불린 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 가공된 다가 및 다특이적 결합 단백질, 이의 제조 방법, 및 특히 질환의 예방, 진단 및/또는 치료에 사용하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하는 결합 단백질로서,

상기 결합 단백질이 NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍과 결합할 수 있는, 결합 단백질.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2가 서열번호 28, 30, 32, 34, 36, 38, 및 40으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

### 청구항 3

VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하는 결합 단백질로서,

상기 결합 단백질이 NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원쌍과 결합할 수 있는, 결합 단백질.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인이 서열번호 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 및 41로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

### 청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 n이 0인 결합 단백질.

### 청구항 6

제1 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇠 및

제2 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇠

를 포함하는 결합 단백질로서,

상기 결합 단백질이 NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원쌍과 결합할 수 있는, 결합 단백질.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인이 서열번호 28, 30, 32, 34, 36, 38, 및 40으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인이 서열번호 29, 31, 33, 35, 37, 39, 및 41로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

#### 청구항 8

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, X1 또는 X2가 서열번호 1 내지 26으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열인, 결합 단백질.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 결합 단백질이 2개의 제1 폴리펩타이드 쇠 및 2개의 제2 폴리펩타이드 쇠를 포함하는, 결합 단백질.

#### 청구항 10

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역이 본래의 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 결합 단백질.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD 기원의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 결합 단백질.

#### 청구항 12

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇠의 VD1 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇠의 VD1이 각각 동일한 제1 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득되는, 결합 단백질.

#### 청구항 13

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇠의 VD1 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇠의 VD1이 각각 상이한 제1 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득되는, 결합 단백질.

#### 청구항 14

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇠의 VD2 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇠의 VD2가 각각 동일한 제1 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득되는, 결합 단백질.

#### 청구항 15

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇄의 VD2 및 상기 제2 폴리펩타이드 쇄의 VD2가 각각 상이한 제1 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득되는, 결합 단백질.

#### 청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 모 항체가 상기 항원상의 상이한 에피토프에 결합하는, 결합 단백질.

#### 청구항 17

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 효능과 상이한 효능으로 상기 제1 항원에 결합하는, 결합 단백질.

#### 청구항 18

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 친화성과 상이한 친화성으로 상기 제1 항원에 결합하는, 결합 단백질.

#### 청구항 19

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 사람 항체, CDR 접목 항체 및 사람화된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

#### 청구항 20

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 Fab 단편; F(ab')<sub>2</sub> 단편; 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 단일 암(arm)의 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; dAb 단편; 분리된 상보성 결정 영역(CDR); 단일쇄 항체; 및 이중항체(diabody)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

#### 청구항 21

제1항, 제3항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 또는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 나타내는, 결합 단백질.

#### 청구항 22

제22항에 있어서, 상기 목적하는 성질이 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택되는, 결합 단백질.

#### 청구항 23

제21항에 있어서, 상기 항체 파라미터가 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인지, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약리학, 생물유용성, 조직 교차 반응성, 및 유사 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

#### 청구항 24

4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는, 2개의 항원과 결합할 수 있는 결합 단백질로서,

2개의 폴리펩타이드 쇄가 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이다]를 포함하고;

2개의 폴리펩타이드 쇠가 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하며;

상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인이 서열번호 28, 30, 32, 34, 36, 38, 및 40으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인이 서열번호 29, 31, 33, 35, 37, 39, 및 41로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

#### 청구항 25

4개의 폴리펩타이드 쇠를 포함하는, 2개의 항원과 결합할 수 있는 결합 단백질로서,

2개의 폴리펩타이드 쇠가 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하고;

2개의 폴리펩타이드 쇠가 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

n은 0 또는 1이다]를 포함하며;

상기 DVD-Ig가 CD-20, CD-19, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인슐린 유사 성장 인자 수용체(IGF1R), 및 NKG2D로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 항원과 결합하는, 결합 단백질.

#### 청구항 26

제1항, 제3항, 제6항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적에 대해 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 적어도 약  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 적어도 약  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 적어도 약  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 적어도 약  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 및 적어

도 약  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 온 속도 상수(on rate constant:  $K_{on}$ )를 갖는, 결합 단백질.

#### 청구항 27

제1항, 제3항, 제6항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적에 대해 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 최대 약  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; 최대 약  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ; 최대 약  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; 및 최대 약  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 오프 속도 상수(off rate constant:  $K_{off}$ )를 갖는, 결합 단백질.

#### 청구항 28

제1항, 제3항, 제6항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적에 대해 최대 약  $10^{-7} \text{ M}$ ; 최대 약  $10^{-8} \text{ M}$ ; 최대 약  $10^{-9} \text{ M}$ ; 최대 약  $10^{-10} \text{ M}$ ; 최대 약  $10^{-11} \text{ M}$ ; 최대 약  $10^{-12} \text{ M}$ ; 및 최대  $10^{-13} \text{ M}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 해리 상수( $K_D$ )를 갖는, 결합 단백질.

#### 청구항 29

면역부작 분자, 이미지화제, 치료제 및 세포독성제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 제제를 추가로 포함하는, 제1항, 제3항, 제6항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 포함하는, 결합 단백질 집합체.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 상기 제제가 방사선표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생발광 표지, 자기 표지 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 이미지화제인, 결합 단백질 집합체.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 상기 이미지화제가  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , 및  $^{153}\text{Sm}$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방사선표지인, 결합 단백질 집합체.

#### 청구항 32

제30항에 있어서, 상기 제제가 항-대사물, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관형성제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아포토시스 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 치료제 또는 세포독성제인, 결합 단백질 집합체.

#### 청구항 33

제1항, 제3항, 제6항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 결정화된 결합 단백질인 결합 단백질.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 결정이 담체 부재 약제학적 제어 방출 결정인, 결합 단백질.

#### 청구항 35

제33항에 있어서, 상기 결합 단백질의 가용성 대응물보다 큰 생체내 반감기를 갖는, 결합 단백질.

#### 청구항 36

제33항에 있어서, 생물학적 활성을 보유하는, 결합 단백질.

#### 청구항 37

제1항, 제3항, 제6항, 제24항 및 제25항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질 아미노산 서열을 암호화하는 분리된 핵산.

#### 청구항 38

제37항에 따른 분리된 핵산을 포함하는 벡터.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO, 및 pBJ로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 벡터.

#### 청구항 40

제38항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 이.콜라이(*E. Coli*)인 숙주 세포.

#### 청구항 43

제40항에 있어서, 진핵 세포인 숙주 세포.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, 상기 진핵 세포가 원생동물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균류 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 숙주 세포.

#### 청구항 45

제43항에 있어서, 상기 진핵 세포가 포유동물 세포, 조류 세포 및 곤충 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 동물 세포인, 숙주 세포.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, CHO 세포인 숙주 세포.

#### 청구항 47

제45항에 있어서, COS인 숙주 세포.

#### 청구항 48

제43항에 있어서, 효모 세포인 숙주 세포.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 상기 효모 세포가 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 숙주 세포.

#### 청구항 50

제45항에 있어서, 곤충 Sf9 세포인 숙주 세포.

#### 청구항 51

결합 단백질을 제조하기에 충분한 조건하에서 배양 배지에서 제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포를 배양함을 포함하는, 결합 단백질을 제조하는 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 제조된 결합 단백질의 50% 내지 75%가 이원 특이적 4가 결합 단백질인 방법.

#### 청구항 53

제51항에 있어서, 제조된 결합 단백질의 75% 내지 90%가 이원 특이적 4가 결합 단백질인 방법.

#### 청구항 54

제51항에 있어서, 제조된 결합 단백질의 90% 내지 95%가 이원 특이적 4가 결합 단백질인 방법.

#### 청구항 55

제51항의 방법에 따라 제조된 단백질.

#### 청구항 56

제1항 내지 제36항 및 제55항 중 어느 한 항의 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 57

제56항에 있어서, 하나 이상의 추가 치료제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, 상기 추가 치료제가 치료제, 이미지화제, 세포독성제, 혈관형성 억제제; 키나제 억제제; 공동 자극 분자 차단제; 부착 분자 차단제; 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능성 단편; 메토크세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제, 진통제, 비스테로이드 소염 약물 (NSAID), 진정제, 마취제, 진정제(sedative), 국부 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화성 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화제, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사선약제, 항우울제, 항정신제, 자극제, 친식 약제, 베타 효능제, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토킨 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 59

제1항 내지 제36항 및 제55항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 피험체에게 투여하여 치료가 달성되는, 피험체의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법.

#### 청구항 60

제59항에 있어서, 상기 장애가 류마티스성 관절염, 골관절염, 연소성 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절증, 전신 홍반성 낭창, 크론 질환, 대장염, 장 염증 질환, 인슐린 의존성 진성 당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기성 질환, 건선, 피부경화증, 이식편 대 숙주 질환, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역 질환, 유육종증, 동맥경화증, 파종성 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브병, 신증후군, 만성 피로 증후군, 베게너 육아종증, 헤노흐-쇼렌라인 자반증, 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질환, 기생충 질환, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 황단성 척수염, 헌팅톤 무도병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 원발성 담즙성 간경변, 용혈성 빈혈, 악성 종양, 심부전증, 심근경색, 애디슨병, 산발성 질환, 다분비선 제I형 결핍증 및 다분비선 제II형 결핍증, 슈미트 증후군, 성인성(급성) 호흡 곤란 증후군, 탈모증, 원형 탈모증, 혈청반응 음성 관절증, 관절증, 라이터병, 건선성 관절증, 폐양성 대장염성 관절증, 장병증성 관절병증, 클라미디아증, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절증, 척추관절증, 죽종 질환/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 질환, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 유천포창, 선상 IgA 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 크윙스 양성 용혈성 빈혈, 후천성 악성 빈혈, 연소성 악성 빈혈, 근통성 뇌염/로얄 프리(Royal Free) 질환, 만성 점막 피부 칸디다증, 거세포 동맥염, 원발성 경화성 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍 질환 증후군, 후천성 면역결핍 관련 질환, B형 간염, C형 간염, 공통 가변성 면역결핍증(공통 가변성 감마글로불린저혈증), 확장형 심근증, 여성 불임증, 난소 부전증, 조숙 난소부전, 섬유성 폐 질환, 잠복성 섬유조직 폐포염, 후-염증성 간질성 폐질환, 간질성 폐렴, 결합 조직 질환 관련 간질성 폐 질환, 조합성 결합 조직 질환 관련 폐 질환, 전신성 경화증 관련 간질성 폐 질환, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐 질환, 전신 홍반성 낭창 관련 폐 질환, 피부근염/다발성 근염 관련 폐 질환, 쇼그렌 질환 관련 폐 질환, 강직성 척추염 관련 폐 질환, 혈관염 범발성 폐 질환, 혈철증 관련 폐 질환, 약물-유도된 간질성 폐 질환, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐색성 세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤성 폐 질환, 감염후 간질성 폐 질환, 통풍성 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염(전형적 자가

면역 또는 루포이드 간염), 2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당증, 흑색 극세포증에 따른 B형 인슐린 저항성, 부갑상선 기능저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역 질환, 기관 이식과 관련된 만성 면역 질환, 골관절증, 원발성 경화성 담관염, 1형 건선, 2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면역 호중구감소증, 신장 질환 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원판양 홍반성 낭창, 남성 불임증 특발증 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발성 경화증(모든 아형), 교감성 안염, 결합 조직 질환에 속발성인 폐 고혈압증, 구드패스튜어 증후군, 결절성 다발성 동맥염의 폐 징후, 급성 류마티스성 열, 류마티스성 척추염, 스틸씨 병, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야스 병/동맥염, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소증, 자가면역 갑상선 질환, 갑상선 기능항진증, 갑상선종증 자가면역 갑상선 기능저하증(하시모토 병), 위축성 자가면역 갑상선 기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 혈관염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간 질환, 만성 간 질환, 알콜성 경변, 알콜 유도 간 손상, 콜레오사타티스(choleostasis), 특이체질성 간 질환, 약물 유도 간염, 비알콜성 지방간염, 알레르기 및 천식, B 그룹 스트렙토코커스(streptococci) (GBS) 감염, 정신 장애(예를 들어, 우울증 및 정신분열증), Th2 형 및 Th1 형 매개 질환, 급성 및 만성 통증(상이한 형태의 통증), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암종 및 조혈 악성종양(백혈병 및 림프종), A베타 지방단백질혈증, 말초정색증, 급성 및 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프성모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전증, 선암종, 공기 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알콜 유도 간염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍, 근위축성 측삭 경화증, 빈혈, 양기나 협심증, 전각 세포 퇴화, 항 cd3 치료, 항 인지질 증후군, 항-수용체 과민성 반응, 대동맥 및 말초 결찰증, 대동맥 해부, 동맥 고혈압, 동맥 경화증, 동정맥 누공, 운동실조증, 심방세동 (지연 또는 발작성), 심방조동, 동정맥 막힘, B 세포 림프종, 골 이식 거부, 골수 이식 (BMT) 거부, 좌각차단, 버키트 림프종, 화상, 심장성 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 종양, 심근증, 심폐 우회 염증 반응, 연골 이식 거부, 소뇌피질 퇴화, 소뇌 장애, 혼란 또는 다초점 심방 빈맥, 화학치료 관련 장애, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 알콜증, 만성 염증 병리, 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 폐쇄 폐 질환(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 결장직장 암종, 울혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐 심장, 관상 동맥 질환, 크루츠펠트-자콕(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 배양 음성 패혈증, 낭성유증, 사이토킨 치료 관련 장애, 권투선수치매(Dementia pugilistica), 탈수초성질환, 땀기 출혈열, 피부염, 피부학적 증상, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환(diabetic atherosclerotic disease), 광범위 루이체 질환, 확장성 울혈성 심근증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군, CNS 도파민 수용체 차단 약물에 의해 유도된 약물 유도 운동 장애, 약물 과민증, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비질환, 후두개염, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 피부홍통증, 추체외로 및 소뇌 장애, 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 태아 흉선 이식 거부, 프리드리히 운동실조증, 기능성 말초 동맥 장애, 진균류 패혈증, 가스괴저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 기관 또는 조직 이식 거부, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 모발 세포 백혈병, 할러포르텐-스파츠 질환 (Hallervorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염, 고초열, 심장 이식 거부, 혈색소증, 혈액투석, 용혈성 요독 증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증, 출혈, 간염(A), 히스 다발 부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨 질환, 과운동성 장애, 과민성 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동 부족 장애, 시상하부-뇌하수체-부신피질계 평가, 특발성 애디슨 질환, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개 세포독성, 무력증, 유아 척추 근육 위축증, 대동맥 염증, 인플루엔자 A, 이온화 방사선 노출, 홍채섬모체염/자궁염/광학적 신경근염, 허혈 관류 손상, 허혈 뇌졸중, 연소성 류마티스 관절염, 연소성 척추 근육 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부, 레지오넬라, 리슈마니아증, 나병, 피질척수계 병변, 지방부종, 간 이식 거부, 림프피부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구종, 악성 흑색종, 뇌막염, 수막염 균혈증, 대사/특발성, 편두통, 미토콘드리아 다중 시스템 장애, 복합 연결 조직 질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발성 골수종, 다발성 시스템 퇴화(만셀 데제린-토마스 쉬-드라거 및 마차도-조셉), 중증 근무력증, 세포내 마이코박테리움 감염증, 마이코박테리움 결핵, 골수이형성증후군, 심근 경색, 심근 허혈 장애, 비인두 암종, 신생아 만성 폐 질환, 신염, 신증, 신경퇴행성 질환, 신경성 I 근육 위축증, 호중구감소성 발열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 지류 폐색, 폐색성 동맥 질환, okt3 치료, 고환염/부고환염, 고환염/절관절제술 반전 과정, 기비대, 골다공증, 췌장 이식 거부, 췌장 암종, 부수종양성 증후군/악성 고칼슘혈증, 부갑상선 이식 거부, 골반 염증 질환, 다년성 비염, 심막 질환, 말초 동맥경화 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군 (다발신경병증, 장기비대, 내분비질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군, MI 후 심장절개 증후군, 자간전증, 전진적 상핵 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 치료, 레이노드 현상 및 질환, 레이노드 질환, 레프섬 질환, 일반 협소 QRS 심근증, 신혈관성고혈압, 재관류 손상, 제한성 심근병증, 육종, 피부경화증, 노인 무도병, 루이체형 노인성 치매, 혈청음성 관절염증, 쇼크, 겸상적혈구 빈혈증, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부, 고형 종양, 특이적 부정맥, 척수운동실조, 척수소뇌 퇴화, 스트렙토코커스 근염, 소뇌 구조적 병변, 아급성 경화

성 범뇌염, 실신, 심혈관계 매독, 전신 아나필락시스, 전신 염증 반응 증후군, 전신 개시 연소성 류마티스 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 말초혈관 확장증, 폐색성 혈전 혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식, 외상/출혈, III형 과민성 반응, IV형 과민성, 불안정 양기나, 요독증, 요로폐혈증, 두드러기, 승모관 심장 질환, 하지 정맥, 혈관염, 정맥동 질환, 정맥중 혈전증, 심실 세동, 바이러스 및 진균류 감염, 바이탈 뇌염/무균성 수막염, 바이탈-연관 적혈구식작용 증후군, 웨른니케-코르사코프 증후군, 윌슨 질환, 임의의 기관 또는 조직의 이중이식 거부, 급성 관상 증후군, 급성 특발성 다발신경근염, 급성 염증 신경근병증, 급성 허혈, 성인 스틸스 질환, 원형탈모증, 아나필락시스증(anaphylaxis), 항-인지질 항체 증후군, 재생불량성빈혈, 동맥경화증, 아토피성 습진, 아토피성 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염과 관련된 자가면역 장애, 자가면역 장병증, 자가면역 난청, 자가면역 림프구증식성 증후군 (ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 미성숙 난소 부전증, 안건염, 기관지확장증, 수포성 유전포창, 심혈관 질환, 악성 항인지질 증후군, 셀리악 질환(celiac disease), 경추 척추증, 만성 허혈, 반흔성 유전포창, 다발성 경화에 대한 위험을 갖는 임상적으로 분리된 증후군(cis), 결막염, 유년기 개시 정신성 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 누낭염, 피부근염, 당뇨 망막증, 진성 당뇨병, 요추간반탈출증, 추간판 내장증, 약물 유도 면역 용혈성 빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 내안구염, 결공막염, 다형홍반, 중증 다형홍반, 임신성 유전포창, 길레인 바레 증후군(Guillain-Barre syndrome) (GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨 질환, 특발성 간질 폐렴, IgE-매개 알레르기, 면역 용혈성 빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구 염증 질환, 염증 수초탈락 질환, 염증 심장 질환, 염증 신장 질환, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성각결막염, 쿠스마울 질환 또는 쿠스마울-마이어 질환, 란드리 마비, 랑게르한스 세포 조직구증, 열성홍반(livedo reticularis), 황반변성, 미시적 혈관염, 경직성 척추염, 운동 뉴런 장애, 점막 유전포창, 다발성 기관 부전증, 중증 근무력증, 골수이형성증, 심근염, 신경근 장애, 신경병증, 비-A 비-B 간염, 시신경염, 골용해, 난소암, 소수관절 JRA, 말초 동맥 폐색성 질환 (PAOD), 말초 혈관 질환 (PVD), 말초 동맥 질환 (PAD), 정맥염, 결절성 다발 동맥염 (또는 결절성 동맥주위염), 다발연골염, 측두동맥염, 회색질척수염, 다발성 관절 JRA, 다발성 내분비 결핍 증후군, 다발성근염, 류마티스성 다발성 근육통 (PMR), 펄프 후 증후군, 1차 파킨슨병, 전립선 및 직장암 및 조혈 악성 (백혈병 및 림프종), 전립선염, 순수적혈구 저형성증, 1차 부신 부전증, 재발성 시속신경근염, 협착증, 류마티스 심장 질환, 사포 (활막염, 여드름, 농포증, 및 골염), 피부경화증, 2차 아밀로이드증, 폐 쇼크, 상공막염, 좌골신경통, 2차 부신 부전증, 실리콘 관련 연결 조직 질환, 스넬돈-윌킨슨(sneddon-wilkinson) 피부증, 강직성 척추염, 스티븐-존슨 증후군 (SJS), 전신 염증 반응 증후군, 일시적 동맥염, 특소플라스믹 망막증, 독성 표피 괴사, 횡단척수염, TRAPS (중양 괴사 인자 수용체, 1형 알레르기 반응, II형 당뇨병, 두드러기, 통상의 간질 폐렴 (UIP), 혈관염, 춘계각결막염, 바이러스 망막염, 보그트-고야나기-하라다(Vogt-Koyanagi-Harada) 증후군 (VKH 증후군), 습윤 황반 퇴화, 상처 치료, 관절병증과 관련된 여시니아 및 살모넬라 증을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복강내, 낭내, 연골내, 강내, 세포내, 소뇌내, 소뇌심실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 일시주사(bolus), 질내, 직장, 협측, 설하, 비내 및 경피투여로부터 선택되는 하나 이상의 방식으로 피검체에 투여되는, 방법.

#### 청구항 62

2개의 항원과 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 제조하는 방법으로서,

하기 제1 및 하기 제2 항원과 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록,

- 제1 항원과 결합할 수 있는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;
- 제2 항원과 결합할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;
- VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고,

C는 중쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역이고

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계;

d)  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고,

C는 경쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고,

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; 및

e) 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시키는 단계를 포함하고,

상기 결합 단백질은 NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원쌍과 결합할 수 있는, 이원 가변 도메인 면역글로불린을 제조하는 방법.

### 청구항 63

제62항에 있어서, 상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인이 서열번호 28, 30, 32, 34, 36, 38, 및 40으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인이 서열번호 29, 31, 33, 35, 37, 39, 및 41로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 64

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 사람 항체, CDR 접목 항체 및 사람화된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 65

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 Fab 단편;  $F(ab')_2$  단편; 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 단일 암(arm)의 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; dAb 단편; 분리된 상보성 결정 영역(CDR); 단일쇄 항체; 및 이중항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 66

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 방법.

### 청구항 67

제62항에 있어서, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는, 방법.

### 청구항 68

제62항에 있어서, 상기 Fc 영역이 본래의 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 69

제62항에 있어서, 상기 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD 기원의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

### 청구항 70

제66항에 있어서, 상기 목적하는 성질이 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 71

제67항에 있어서, 상기 목적하는 성질이 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 72

제70항에 있어서, 상기 항체 파라미터가 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인지, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약리역학, 생물유용성, 조직 교차 반응성, 및 유사 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 73

제71항에 있어서, 상기 항체 파라미터가 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인지, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약리역학, 생물유용성, 조직 교차 반응성, 및 유사 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 74

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 친화성과 상이한 친화성으로 상기 제1 항원에 결합하는, 방법.

#### 청구항 75

제62항에 있어서, 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부가, 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 상기 제2 항원에 결합하는 효능과 상이한 효능으로 상기 제1 항원에 결합하는, 방법.

#### 청구항 76

목적하는 성질을 갖는, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 제조하는 방법으로서,

목적하는 성질을 갖는, 하기 제1 및 하기 제2 항원과 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록,

a) 제1 항원과 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;

b) 제2 항원과 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;

c)  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고,

C는 중쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역이고,

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계;

d)  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고,

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고,

C는 경쇄 불변 도메인이고,

X1은 링커이고, 단, 이것은 CH1이 아니고,

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고,

n은 0 또는 1이다]를 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드쇄를 작제하는 단계; 및

e) 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드쇄를 발현시키는 단계를 포함하고,

상기 결합 단백질은 NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원쌍과 결합할 수 있는, 이원 가변 도메인 면역글로불린을 제조하는 방법.

#### 청구항 77

시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법으로서,

상기 항원 또는 이의 단편은 NKG2D, CD-20, CD-19, EGFR, HER-2 및 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택되고,

상기 방법은 면역검정에 의해 시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하는 단계를 포함하고,

상기 면역검정은 (i) 하나 이상의 결합 단백질과 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생되는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생된 신호와 비교하는 것을 포함하고,

상기 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 또는 이의 단편의 농도가 서로 다른 계측기 시리즈의 일부이고,

상기 하나 이상의 결합 단백질중 하나는 (i')  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체(또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며;  $(X2)_n$ 은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드쇄를 포함하고 (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있고,

상기 검정 후, 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

#### 청구항 78

제77항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 형성하는 단계,

(ii) 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체를 형성하는 단계, 및

(iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제가 하나 이상의 결합 단백질인, 방법.

#### 청구항 79

제77항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편과 접촉시켜 시험 시료중에 존재하는 항원 또는 이의 단편과 검출가능하게 표지된 항원이 서로 경쟁하여 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 이의 단편 복합체를 각각 형성하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포

함하고,

상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고,

포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 양 또는 농도와 반비례하고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

#### 청구항 80

제77항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

#### [청구항 90]

제78항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

#### [청구항 91]

제79항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

#### [청구항 92]

제72항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

#### [청구항 93]

제78항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

#### [청구항 94]

제79항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

#### [청구항 95]

시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법으로서,

상기 항원 또는 이의 단편은 NKG2D, CD20, CD-19, EGFR, HER-2 및 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택되고,

상기 방법은 면역검정에 의해 시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하여 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함하고,

상기 면역검정은 (i) 하나 이상의 결합 단백질과 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생되는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생된 신호와 비교하는 것을 포함하고,

상기 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 또는 이의 단편의 농도가 서로 다른 계측기 시리즈의 일부이고,

상기 하나 이상의 결합 단백질중 하나는 (i')  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며;  $(X2)_n$ 은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드쇄를 포함하고 (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이

루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있고,

상기 검정에 의해 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

[청구항 96]

제95항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 형성하는 단계,

(ii) 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체를 형성하는 단계, 및

(iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제가 하나 이상의 결합 단백질인, 방법.

[청구항 97]

제95항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편과 접촉시켜 시험 시료중에 존재하는 항원 또는 이의 단편과 검출가능하게 표지된 항원이 서로 경쟁하여 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 이의 단편 복합체를 각각 형성하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고,

포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 양 또는 농도와 반비례하고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

[청구항 98]

제95항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 99]

제96항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 100]

제97항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 101]

제95항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 102]

제96항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 103]

제97항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 104]

시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법으로서,

상기 항원 또는 이의 단편은 NKG2D, CD20, CD-19, EGFR, HER-2 및 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택되고,

상기 방법은 면역검정에 의해 시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하여 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함하고,

상기 면역검정은 (i) 하나 이상의 결합 단백질과 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생되는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생된 신호와 비교하는 것을 포함하고,

상기 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 또는 이의 단편의 농도가 서로 다른 계측기 시리즈의 일부이고,

상기 하나 이상의 결합 단백질중 하나는 (i')  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)<sub>n</sub>은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제1 폴리펩타이드 쇄 및  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)<sub>n</sub>은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있고,

상기 검정 후, 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

[청구항 105]

제104항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 형성하는 단계,

(ii) 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체를 형성하는 단계, 및

(iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제가 하나 이상의 결합 단백질이고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

[청구항 106]

제104항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체가

형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편과 접촉시켜 시험 시료중에 존재하는 항원 또는 이의 단편과 검출가능하게 표지된 항원이 서로 경쟁하여 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 이의 단편 복합체를 각각 형성하는 단계, 및

(ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고,

포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 양 또는 농도와 반비례하고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

[청구항 107]

제104항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 108]

제105항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 109]

제106항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 110]

제104항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 111]

제105항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 112]

제106항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 113]

시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법으로서,

상기 항원 또는 이의 단편은 NKG2D, CD20, CD-19, EGFR, HER-2 및 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택되고,

상기 방법은 면역검정에 의해 시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하여 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함하고,

상기 면역검정은 (i) 두 개의 항원과 결합할 수 있는 하나 이상의 DVD-Ig와 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생하는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생한 신호와 비교하는 것을 포함하고,

상기 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 또는 이의 단편의 농도가 서로 다른 계측기 시리즈의 일부이고,

상기 하나 이상의 DVD-Ig중 하나는 (i') 4개의 폴리펩타이드쇄 (여기서, 제1 및 제3 폴리펩타이드쇄는 제1 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함하고, 제2 및 제4 폴리펩타이드쇄는 제2 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한다)를 포함하고, (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있는, 방법.

[청구항 114]

제113항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 형성하는 단계,

(ii) 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 또는 이의 단편의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체를 형성하는 단계, 및

(iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 또는 이의 단편/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제가 하나 이상의 DVD-Ig인, 방법.

[청구항 115]

제114항에 있어서, 상기 방법이

(i) 시험 시료를 항원 또는 이의 단편과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편과 접촉시켜 시험 시료중에 존재하는 항원 또는 이의 단편과 검출가능하게 표지된 항원이 서로 경쟁하여 포획제/항원 또는 이의 단편 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 이의 단편 복합체를 각각 형성하는 단계,

(ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고,

상기 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 DVD-Ig이고,

포획제/검출가능하게 표지된 항원 또는 이의 단편에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편의 양 또는 농도와 반비례하고, 이때 상기 시료 중의 항원의 존재 또는 이의 단편의 양 또는 농도가 결정되는, 방법.

[청구항 116]

제113항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 117]

제114항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 118]

제115항에 있어서, 상기 시험 시료가 환자로부터 채취된 것이고, 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함하고, 만일 상기 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 추가로, 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함하는, 방법.

[청구항 119]

제113항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 120]

제114항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 121]

제115항에 있어서, 상기 방법이 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용하기에 적합한, 방법.

[청구항 122]

시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하기 위한 키트로서,

상기 키트는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 상기 성분 하나 이상은 (i') VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)<sub>n</sub>은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고 (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있는 결합 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 상기 결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지되는, 키트.

[청구항 123]

시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하기 위한 키트로서,

상기 키트는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 상기 성분 하나 이상은 (i') VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)<sub>n</sub>은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고 (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있는 결합 단백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 상기 결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지되는, 키트.

[청구항 124]

시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하기 위한 키트로서,

상기 키트는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 상기 성분 하나 이상은 (i') 제1 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)<sub>n</sub>은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제1 폴리펩타이드 쇄와 제2 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)<sub>n</sub>은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하고 (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있는 결합 단

백질을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 상기 결합 단백질은 임의로 검출가능하게 표지되는, 키트.

시험 시료를 항원 또는 이의 단편에 대해 검정하기 위한 키트로써,

상기 키트는 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 또는 이의 단편을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 상기 성분 하나 이상은 (i') 4개의 폴리펩타이드쇄 (여기서, 제1 및 제3 폴리펩타이드쇄는 제1  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고;  $VD2$ 는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며;  $C$ 는 중쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우  $CH1$ 이 아니며;  $(X2)_n$ 은  $Fc$  영역이고 임의로 존재한다]을 포함하고, 제2 및 제4 폴리펩타이드쇄는 제2  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고;  $VD2$ 는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며;  $C$ 는 경쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우  $CH1$ 이 아니며;  $(X2)_n$ 은  $Fc$  영역이고 임의로 존재한다]을 포함한다)를 포함하고 (ii') NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19; NKG2D와 EGFR; NKG2D와 HER-2; 및 NKG2D와 IGF1R로 이루어진 그룹중에서 선택된 한 쌍의 항원과 결합할 수 있는 DVD-Ig을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함하고, 상기 DVD-Ig는 임의로 검출가능하게 표지되는, 키트.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2009년 7월 29일자로 출원된 미국 임시 특허 출원 제61/229,586호 및 2009년 10월 19일자로 출원된 미국 임시 특허 출원 제61/252,790호에 대한 우선권을 주장하고, 이들은 임의의 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로서 명확히 인용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 NKG2D에 결합하는 다가 및 다특이적 결합 단백질, 이의 제조 방법 및 특히, 급성 및 만성 염증 질환, 암 및 기타 질환의 예방 및/또는 치료에 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경기술

[0005] 2개 이상의 항원에 결합하는 다특이적 항체와 같이 가공된 단백질은 당업계에 공지되어 있다. 당해 다특이적 결합 단백질은 세포 융합, 화학적 접합 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0006] 이특이적 항체는 이특이적 항체의 목적하는 특이성을 갖는 쥐 모노클로날 항체(mAb)를 발현하는 2개의 상이한 하이브리도마 세포주의 체세포 융합을 기초로 하는 쿼드로마(quadroma) 기술 (문헌참조: Milstein, C. and Cuello, A.C.(1983) Nature 305(5934): p. 537-40)을 사용하여 제조되었다. 수득한 하이브리드-하이브리도마 (또는 쿼드로마) 세포주내에서 2개의 상이한 면역글로불린(Ig) 중쇄 및 경쇄의 무작위 쌍 형성 때문에, 10개 이하의 상이한 Ig 종이 제조되고 이중에 하나만이 기능성 이특이적 항체이다. 잘못된 쌍을 형성한 부산물의 존재 및 상당히 감소된 생산 수율은 정교한 정제 과정이 요구됨을 의미한다.

[0007] 이특이적 항체는 2개의 상이한 mAb의 화학적 접합에 의해 제조될 수 있다 (문헌참조: Staerz, U.D., et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31). 당해 방법은 균질의 제제를 생성시키지 못한다. 다른 방법은 2개의 상이한 mAb 또는 보다 소형의 항체 단편의 화학적 접합을 사용하였다(문헌참조: Brennan, M., et al.(1985) Science 229(4708): 81-3).

[0008] 이특이적 항체를 생성하기 위해 사용되는 또 다른 방법은 이중 이기능성 가교링커를 사용하여 2개의 모 항체를 커플링시키는 것이지만 수득한 이특이적 항체는 가교링커와 모 항체의 반응이 부위 특이적이지 않기 때문에 분자적으로 상당히 이종성이다. 이특이적 항체의 보다 균질의 제제를 수득하기 위해, 2개의 상이한 Fab 단편은 부위 특이적 방식으로 이들의 힌지 시스템 잔기에서 화학적으로 가교결합되었다(문헌참조: Glennie, M.J., et al.(1987) J. Immunol. 139(7): 2367-75). 그러나, 이러한 방법으로는 완전한 IgG 분자가 아닌 Fab'2 단편이 수득된다.

[0009] 광범위한 기타 재조합 이특이적 항체 포맷이 최근에 개발되었다(문헌참조: Kriangkum, J., et al.(2001)

Biomol. Engin. 18(2): 31-40). 이들중에서, 탠덤(tandem) 단일쇄 Fv 분자 및 이중항체(diabody) 및 이의 다양한 유도체가 가장 광범위하게 사용된다. 통상적으로, 이들 분자의 작제는 상이한 항원을 인지하는 2개의 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로부터 시작된다(문헌참조: Economides, A.N., et al.(2003) Nat. Med. 9(1): 47-52). 탠덤 scFv 분자(taFv)는 추가의 펩타이드 링커를 사용하여 단순히 2개의 scFv 분자를 연결하는 끝은 포맷을 나타낸다. 탠덤 scFv 분자에 존재하는 2개의 scFv 단편은 분리된 폴딩 실체를 형성한다. 다양한 링커를 사용하여 2개의 scFv 단편을 연결시킬 수 있고 링커의 길이는 63개 이하의 잔기이다(문헌참조: Nakanishi, K., et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-74). 모 scFv 단편은 보통 세균에서 가용성 형태로 발현될 수 있지만 탠덤 scFv 분자는 흔히 세균에서 불용성 응집체를 형성하는 것으로 관찰된다. 따라서, 재폴딩 프로토콜 또는 포유동물 발현 시스템의 사용이 가용성 탠덤 scFv 분자를 제조하는데 적용된다. 최근 연구에서, CD28 및 흑색종 관련 프로테오글리칸에 대해 지시된 탠덤 scFv의 유전자 전이 래빗 및 소에 의한 생체내 발현이 보고되었다(문헌참조: Gracie, J.A., et al.(1999) J. Clin. Invest. 104(10): 1393-401). 당해 작제에서, 2개의 scFv 분자는 CH1 링커에 의해 연결되고 이특이적 항체의 혈청 농도는 100mg/L 이하인 것으로 밝혀졌다. 도메인 정렬의 변이 및 다양한 길이 또는 유연성을 갖는 중간 링커의 사용을 포함하는 다양한 전략을 사용하여 세균에서 가용성으로 발현시킬 수 있었다. 현재 몇몇 연구가 세균에서, 매우 짧은 Ala3 링커 또는 긴 글라이신/세린 풍부 링커를 사용한 가용성 탠덤 scFv 분자의 발현을 보고하였다(문헌참조: Leung, B.P., et al. (2000) J. Immunol. 164(12): 6495-502; Ito, A., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4802-9; Karni, A., et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125(1-2): 134-40). 최근 연구에서, 길이가 3개 또는 6개 잔기인 무작위 중간 링커를 포함하는 탠덤 scFv 레퍼토리의 파아지 디스플레이를 사용하여 세균에서 가용성 및 활성 형태로 생성되는 분자를 집적시켰다. 당해 방법으로 6개의 아미노산 잔기 링커를 갖는 탠덤 scFv 분자를 분리하였다(문헌참조: Arndt, M. and Krauss J. (2003) Methods Mol. Biol. 207: 305-21). 당해 링커 서열이 탠덤 scFv 분자의 가용성 발현을 위한 일반적인 해결책이 되는지는 불명확하다. 하지만, 당해 연구는 지시된 돌연변이 유발과 병용하여 탠덤 scFv 분자의 파아지 디스플레이가 세균에서 활성 형태로 발현될 수 있는 분자를 집적시키기 위한 강력한 도구임을 입증하였다.

[0010]

이특이적 이중항체 (Db)는 발현을 위해 이중항체 포맷을 사용한다. 이중항체는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 링커의 길이를 약 5개의 잔기로 감소시킴에 의해 scFv 단편들로부터 제조된다(문헌참조: Peipp, M. and Valerius, T. (2002) Biochem. Soc. Trans. 2002. 30(4): 507-11). 당해 링커 크기의 감소는 VH와 VL 도메인의 교차 쌍형성에 의한 2개의 폴리펩타이드 쇄의 이량체화를 촉진시킨다. 이특이적 이중항체는 동일 세포내에서 VHA-VLB 및 VHB-VLA의 구조 (VH-VL 배열), 또는 VLA-VHB 및 VLB-VHA의 구조 (VL-VH 배열) 중 어느 하나를 갖는 2개의 폴리펩타이드 쇄를 발현시킴에 의해 제조된다. 다수의 광범위한 상이한 이특이적 이중항체가 과거에 제조되었었고 이들 대부분은 세균에서 가용성 형태로 발현될 수 있다. 그러나, 최근 비교 연구는 가변성 도메인의 배열이 활성 결합부위의 발현 및 형성에 영향을 줄 수 있음을 입증한다(문헌참조: Mack, M. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(15): 7021-5). 하지만, 세균에서 가용성 발현은 탠덤 scFv 분자에 비해 중요한 잇점을 나타낸다. 그러나, 2개의 상이한 폴리펩타이드 쇄는 단일 세포내에서 발현되기 때문에, 불활성 동종이량체가 활성 이종이량체와 함께 생성될 수 있다. 이로써, 이특이적 이중항체의 균질의 제제를 수득하기 위해서는 추가의 정제 단계의 수행이 필요하다. 이특이적 이중항체를 생성시키는 한가지 방법은 크놉-인투-홀(knob-into-hole) 이중항체를 생성시키는 것이다(문헌참조: Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14): 6444-8,18). 이것은 HER2 및 CD3에 대해 지시된 이특이적 이중항체에 대해 입증되었다. Val37을 Phe로 대체하고 Leu45를 Trp로 대체함에 의해 대형 크놉이 VH 도메인에 도입되었고 항-HER2 또는 항-CD3 가변 도메인에서, Phe98을 Met로 돌연변이시키고 Tyr87을 Ala로 돌연변이시킴에 의해 상보적인 홀을 VL 도메인에 생성시켰다. 당해 방법을 사용함에 의해 이특이적 이중항체의 생산은 모 이중항체에 의한 72%에서 크놉 인투 홀 이중항체에 의해 90% 이상으로 증가될 수 있었다. 중요하게도, 생산 수율은 이들 돌연변이 결과로서 단지 약간 감소하였다. 그러나, 몇몇 분석된 작제물에 대해서 항원 결합 활성의 감소가 관찰되었다. 따라서, 이것은 당해 방법이 결합 활성이 변형되지 않은 이종이량체성 분자를 생산하는 돌연변이를 동정하기 위해 다양한 작제물의 분석을 필요로 함을 시사한다. 또한, 당해 방법은 생체내 안정성이 불량하고 약리학학이 바람직하지 못한 불변 영역에서의 면역글로불린 서열을 돌연변이로 변형시킴에 따라서 면역원성을 증가시킬 수 있는 비고유 및 비천연 형태의 항체 서열을 제조할 필요가 있다.

[0011]

단일쇄 이중항체 (scDb)는 이특이적 이중항체형 분자(diabody-like molecule)의 형성을 개선시키기 위한 또 다른 전략을 제공한다(문헌참조: Holliger, P. and Winter, G. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al.(1996) Immunotechnology 2(1): 21-36). 이특이적 단일쇄 이중항체는 길이가 약 15개 아미노산 잔기인 추가의 중간 링커를 사용하여 2개의 이중항체 형성 폴리펩타이드를 연결시킴에 의해 제조된

다. 결론적으로, 단량체 단일쇄 이중항체에 상응하는 분자량(50-60 kDa)을 갖는 모든 분자는 이특이적이다. 몇몇 연구는 이특이적 단일쇄 이중항체가 세균에서 가용성 및 활성 형태로 발현되고 다수의 정제된 분자가 단량체로서 존재함을 입증하였다 (문헌참조: Holliger, P. and Winter, G. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al.(1996) Immunotechnology. 2(1): 21-36; Pluckthun, A. and Pack, P. (1997) Immunotechnology. 3(2): 83-105; Ridgway, J.B., et al.(1996) Protein Engin. 9(7): 617-21). 따라서, 단일쇄 이중항체는 탠덤 scFv의 잇점(모든 단량체는 이특이적이다)과 이중항체의 잇점(세균에서 가용성 발현)을 갖는다.

[0012] 보다 최근에, 이중항체는 Fc로 융합되어 이중-이중항체로 호칭되는 보다 Ig와 유사한 분자를 제조하였다(문헌참조: Lu, D., et al.(2004) J Biol Chem 279(4): 2856-65). 또한, IgG의 중쇄에서 2개의 Fab 반복체를 포함하고 4개의 항원 분자에 결합하는 다가의 항체 작제물이 보고되었다(문헌참조: WO 0177342A1, and Miller, K., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61).

[0013] 당업계에서는 2개 이상의 항원에 결합하는 개선된 다가 결합 단백질이 요구된다. 미국 특허원 제7,612,181호는 고친화성으로 2개 이상의 항원에 결합하는 신규 계열의 결합 단백질을 제공하고, 이는 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig<sup>TM</sup>)으로 호칭된다. 본 발명은 2개 이상의 항원에 결합하는 추가의 신규 결합 단백질을 제공한다.

### 발명의 내용

[0014] 본 발명은 2개 이상의 항원에 결합하는 다가 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 고친화성으로 2개 이상의 항원과 결합할 수 있는 신규 계열의 결합 단백질을 제공한다.

[0015] 하나의 양태에서, 본 발명은 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, C는 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 폴리펩타이드이고, X2는 Fc 영역이고, n은 0 또는 1이다]을 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 하나의 양태에서, 결합 단백질의 VD1 및 VD2는 중쇄 가변 도메인이다. 또 다른 양태에서, 중쇄 가변 도메인은 쥐 중쇄 가변 도메인, 사람 중쇄 가변 도메인, CDR 접목 중쇄 가변 도메인 및 사람화된 중쇄 가변 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, VD1 및 VD2는 동일한 항원에 결합한다. 또 다른 양태에서, VD1 및 VD2는 상이한 항원에 결합한다. 또 다른 양태에서, C는 중쇄 불변 도메인이다. 예를 들어, X1은 링커이고, 단 X1은 CH1이 아니다. 예를 들어, X1은 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>(서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTIVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS(서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP(서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP(서열번호 28)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 링커이다. 하나의 양태에서, X2는 Fc 영역이다. 또 다른 양태에서, X2는 변이 Fc 영역이다.

[0016] 하나의 양태에서, 상기된 결합 단백질은 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이고, 단 이것은 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역이다]를 포함하는 폴리펩타이드쇄를 포함한다.

[0017] 하나의 양태에서, 결합 단백질의 VD1 및 VD2는 경쇄 가변 도메인이다. 하나의 양태에서, 경쇄 가변 도메인은 쥐 경쇄 가변 도메인, 사람 경쇄 가변 도메인, CDR 접목 경쇄 가변 도메인 및 사람화된 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 양태에서, VD1 및 VD2는 동일한 항원에 결합한다. 또 다른 양태에서, VD1 및 VD2는 상이한 항원에 결합한다. 하나의 양태에서, C는 경쇄 불변 도메인이다. 또 다른 양태에서, X1은 링커이고, 단 X1은 CL1이 아니다. 하나의 양태에서, X1은 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>(서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTIVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24);

GPAKELTPLKEAKVS (서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS (서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (서열번호 28)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 링커이다. 하나의 양태에서, 결합 단백질은 X2를 포함하지 않는다.

[0018] 하나의 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 둘 다 동일한 링커를 포함한다. 또 다른 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 상이한 링커를 포함한다. 또 다른 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 둘다는 짧은(약 6개 아미노산) 링커를 포함한다. 또 다른 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 긴(6개 초과 아미노산) 링커를 포함한다. 또 다른 양태에서, 가변 중쇄는 짧은 링커를 포함하고, 가변 경쇄는 긴 링커를 포함한다. 또 다른 양태에서, 가변 중쇄는 긴 링커를 포함하고, 가변 경쇄는 짧은 링커를 포함한다.

[0019] 하나의 양태에서, 상기된 결합 단백질은  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 경쇄 가변 도메인이고,  $VD2$ 는 제2 경쇄 가변 도메인이고,  $C$ 는 경쇄 불변 도메인이고,  $X1$ 은 링커이고, 단, 이것은  $CH1$ 이 아니고,  $X2$ 는  $Fc$  영역을 포함하지 않는다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함한다.

[0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공하고, 이때, 제1 폴리펩타이드 쇄는  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 중쇄 가변 도메인이고,  $VD2$ 는 제2 중쇄 가변 도메인이고,  $C$ 는 중쇄 불변 도메인이고,  $X1$ 은 링커이고, 단, 이것은  $CH1$ 이 아니고,  $X2$ 는  $Fc$  영역이다]를 포함하고; 제2 폴리펩타이드 쇄는  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 경쇄 가변 도메인이고,  $VD2$ 는 제2 경쇄 가변 도메인이고,  $C$ 는 경쇄 불변 도메인이고,  $X1$ 은 링커이고, 단 이것은  $CH1$ 이 아니고,  $X2$ 는  $Fc$  영역을 포함하지 않는다]를 포함한다. 특히 바람직하게, 이원 가변 도메인 (DVD) 결합 단백질은 4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 이때, 제1의 2개의 폴리펩타이드 쇄는 각각  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 중쇄 가변 도메인이고,  $VD2$ 는 제2 중쇄 가변 도메인이고,  $C$ 는 중쇄 불변 도메인이고,  $X1$ 은 링커이고, 단, 이것은  $CH1$ 이 아니고,  $X2$ 는  $Fc$  영역이다]를 포함하고; 제2의 2개의 폴리펩타이드 쇄는 각각  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 경쇄 가변 도메인이고,  $VD2$ 는 제2 경쇄 가변 도메인이고,  $C$ 는 경쇄 불변 도메인이고,  $X1$ 은 링커이고, 단, 이것은  $CH1$ 이 아니고,  $X2$ 는  $Fc$  영역을 포함하지 않는다]를 포함한다. 당해 이원 가변 도메인(DVD) 단백질은 4개의 항원 결합부위를 갖는다.

[0021] 또 다른 양태에서, 상기된 결합 단백질은 하나 이상의 표적에 결합한다. 하나의 양태에서, 당해 표적은 사이토킨, 세포 표면 단백질, 효소 및 수용체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적의 생물학적 기능을 조절한다. 또 다른 양태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적을 중화시킨다. 본 발명의 결합 단백질은 림포킨, 모노킨 및 폴리펩타이드 호르몬, 수용체 및 종양 마커로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 사이토키네 결합한다. 예를 들어, 본 발명의 DVD-Ig는 하기한 것중 2개 이상과 결합할 수 있다: CD-20, CD-19, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체(IGF1R), 및 NKG2D(또한 표 2 참조). 특정 양태에서, 결합 단백질은 NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19(서열 1); NKG2D와 EGFR(서열 1); NKG2D와 EGFR(서열 2); NKG2D와 HER-2(서열 1); NKG2D와 IGF1R(서열 1); 및 NKG2D와 EGFR(서열 3)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적 쌍과 결합한다.

[0022] 또 다른 양태에서, NKG2D 및 CD-20에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 50과 서열번호 52로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 51과 서열번호 53으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D 및 CD-20에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 50의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 51의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, NKG2D 및 CD-20에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고, 서열번호 52의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 53의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 또 다른 양태에서, NKG2D 및 CD-19(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 54와 서열번호 56으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 55와 서열번호 57로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D 및 CD-19(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 54의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 55의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, NKG2D 및 CD-19(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고, 서열번호 56의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 57의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] 또 다른 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 2)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 58과 서열번호 60으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 59와 서열번호 61로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 2)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 58의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 59의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양

태에서, NKG2D와 EGFR(서열 2)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고 서열번호 60의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 61의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 또 다른 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 62와 서열번호 64로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 63과 서열번호 65로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 62의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 63의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고 서열번호 64의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 65의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 또 다른 양태에서, NKG2D와 HER-2(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 66과 서열번호 68로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 67과 서열번호 69로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D와 HER-2(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 66의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 67의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, NKG2D와 HER-2(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고, 서열번호 68의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 69의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 또 다른 양태에서, NKG2D와 IGFR1(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 70과 서열번호 72로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 71과 서열번호 73으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D와 IGFR1(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 70의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 71의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, NKG2D와 IGFR1(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고, 서열번호 72의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 73의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 또 다른 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 3)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 74와 서열번호 76으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 중쇄 아미노산 서열; 및 서열번호 75와 서열번호 77로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 3)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 74의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 75의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, NKG2D와 EGFR(서열 3)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 역 배향을 갖고, 서열번호 76의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 77의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모 항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고,  $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해  $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재이고;  $(X2)_n$ 은 Fc 영역이고 이때 당해  $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 하나의 양태에서, Fc 영역은 결합 단백질로부터 부재이다.

[0030] 또 다른 양태에서, 본 발명은  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모 항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고,  $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해  $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재이고;  $(X2)_n$ 은 Fc 영역을 포함하지 않고 이때 당해  $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 하나의 양태에서,  $(X2)_n$ 은 결합 단백질로부터 부재이다.

[0031] 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 제1  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모 항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고,  $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해  $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재이고;  $(X2)_n$ 은 Fc 영역이고 이때 당해  $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 제1 폴리펩타이드 쇄, 및 제2  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모 항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고,  $(X1)_n$ 은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해  $(X1)_n$ 은 존재하거나 부재이고;  $(X2)_n$ 은 Fc 영역을 포함하지 않고 이때 당해  $(X2)_n$ 은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함한다. 또 다른 양태에서, 당해 결합 단백질은 2개의 제1 폴리펩타이드 쇄 및 2개의 제2 폴

리펩타이드를쇄를 포함한다. 또 다른 양태에서, (X2)<sub>n</sub>은 제2 폴리펩타이드로부터 부재이다. 또 다른 양태에서, 제1 폴리펩타이드에 존재하는 경우 Fc 영역은 고유 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, Fc 영역은 IgG1 기원의 Fc 영역, IgG2 기원의 Fc 영역, IgG3 기원의 Fc 영역, IgG4 기원의 Fc 영역, IgA 기원의 Fc 영역, IgM 기원의 Fc 영역, IgE 기원의 Fc 영역, 및 IgD 기원의 Fc 영역으로부터 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은, 각각의 제1 및 제3 폴리펩타이드쇄가 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)<sub>n</sub>은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해 (X1)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이고; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 이때 당해 (X2)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이다]를 포함하고, 각각의 제2 및 제4 폴리펩타이드쇄가 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)<sub>n</sub>은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해 (X1)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이고; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역을 포함하지 않고 이때 당해 (X2)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 4개의 폴리펩타이드쇄를 포함하는 2개의 항원에 결합하는 DVD-Ig이다.

[0033] 본 발명은 모 항체를 미리 선별함에 의해 DVD-Ig 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 2개의 항원과 결합하는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 제조하는 방법은 a) 제1 항원에 결합하는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; b) 제2 항원에 결합하는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; c) 각각 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)<sub>n</sub>은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해 (X1)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이고; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 이때 당해 (X2)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드쇄를 작제하는 단계; d) 각각 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)<sub>n</sub>은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해 (X1)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이고; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역을 포함하지 않고 이때 당해 (X2)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드쇄를 작제하는 단계; 및 e) 상기 제1 항원 및 상기 제2 항원에 결합하는 DVD-Ig이 생성되도록 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드쇄를 발현시키는 단계를 포함한다.

[0034] 또 다른 양태에서, 본 발명은 목적하는 성질을 갖는 2개의 항원에 결합하는 DVD-Ig을 제조하는 방법을 제공하고, 당해 방법은 a) 제1 항원에 결합하고 DVD-Ig에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; b) 제2 항원과 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)를 수득하는 단계; c) VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)<sub>n</sub>은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해 (X1)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이고; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역이고 이때 당해 (X2)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드쇄를 작제하는 단계; d) VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부(이것은 제1 모항체와 동일하거나 또는 상이할 수 있다)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, (X1)<sub>n</sub>은 링커이고, 단, 이것이 CH1이 아닌 경우 당해 (X1)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이고; (X2)<sub>n</sub>은 Fc 영역을 포함하지 않고 이때 당해 (X2)<sub>n</sub>은 존재하거나 부재이다]를 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드쇄를 작제하는 단계; 및 e) 상기 제1 및 제2 항원과 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드쇄를 발현시키는 단계를 포함한다.

[0035] 하나의 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드쇄의 VD1은 동일한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드쇄의 VD1은 상이한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드쇄의 VD2는 동일한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드쇄의 VD2는 상이한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다.

- [0036] 하나의 양태에서 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 동일한 항체이다. 또 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 상이한 항체이다.
- [0037] 하나의 양태에서 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제1 항원과 결합하고 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 항원과 결합한다. 특정 양태에서, 제1 및 제2 항원은 동일한 항원이다. 또 다른 양태에서, 모 항체는 동일한 항원상에 상이한 에피토프와 결합한다. 또 다른 양태에서 제1 및 제2 항원은 상이한 항원이다. 또 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 제2 항원과 결합하는 효능과는 상이한 효능으로 제1 항원과 결합한다. 또 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 제2 항원과 결합하는 친화성과 상이한 친화성으로 제1 항원과 결합한다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 사람 항체, CDR 접목 항체 및 사람화된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 양태에서, 항원 결합부는 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, dAb 단편, 분리된 상보성 결정 영역(CDR), 단일쇄 항체 및 이중항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 또는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는다. 또한, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는다. 하나의 양태에서, 당해 목적하는 성질은 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 당해 항체 파라미터는 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인지, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동력, 생물유용성, 조직 교차 반응성 및 동족 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 양태에서, 결합 단백질은 다가이다. 또 다른 양태에서, 결합 단백질은 다특이적이다. 본원에 기재된 다가 및 다특이적 결합 단백질은 특히 치료학적 관점에서 바람직할 수 있는 성질을 갖는다. 예를 들어, 다가 및 다특이적 결합 단백질은 (1) 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체 보다 신속하게 내재화(및/또는 동화)될 수 있고; (2) 효능제 항체일 수 있고/있거나 (3) 다가 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 세포사 및/또는 아포토시스를 유발할 수 있다. 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질의 하나 이상의 항원 결합 특이성을 제공하는 "모 항체"는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 내재화(및/또는 동화)되는 것일 수 있고/있거나 효능제, 세포사 유도 및/또는 아포토시스 유도 항체일 수 있고 본원에 기재된 바와 같은 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질은 이들 성질중 하나 이상이 개선됨을 나타낼 수 있다. 더욱이, 모 항체는 이들 성질중 임의의 하나 이상이 결여될 수 있지만 본원에 기재된 바와 같은 다가 결합 단백질로서 작제되는 경우 이들 성질들이 부여될 수 있다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 하나 이상의 표적에 대해 약  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  이상; 약  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  이상; 약  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  이상; 약  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  이상 및 약  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  이상으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 온 속도 상수(Kon)를 갖는다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 하나 이상의 표적에 대해 약  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 약  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 약  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  또는 약  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 온 속도 상수(Kon)를 갖는다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 하나 이상의 표적에 대해 약  $10^3 \text{ s}^{-1}$  이하; 약  $10^4 \text{ s}^{-1}$  이하; 약  $10^5 \text{ s}^{-1}$  이하 및 약  $10^6 \text{ s}^{-1}$  이하로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 오프 속도 상수(Koff)를 갖는다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 하나 이상의 표적에 대해 약  $10^3 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^4 \text{ s}^{-1}$ ; 약  $10^4 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^5 \text{ s}^{-1}$  또는 약  $10^5 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^6 \text{ s}^{-1}$ 의 오프 속도 상수(Koff)를 갖는다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적에 대해 약  $10^{-7} \text{ M}$  이하; 약  $10^{-8} \text{ M}$  이하; 약  $10^{-9} \text{ M}$  이하; 약  $10^{-10} \text{ M}$  이하; 약  $10^{-11} \text{ M}$  이하; 약  $10^{-12} \text{ M}$  이하 및  $10^{-13} \text{ M}$  이하로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 해리 상수(K<sub>d</sub>)를 갖는다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 이의 표적에 대해 약  $10^{-7} \text{ M}$  내지 약  $10^{-8} \text{ M}$ ; 약  $10^{-8} \text{ M}$  내지 약  $10^{-9} \text{ M}$ ; 약  $10^{-9} \text{ M}$  내지 약  $10^{-10} \text{ M}$ ; 약  $10^{-10} \text{ M}$  내지 약  $10^{-11} \text{ M}$ ; 약  $10^{-11} \text{ M}$  내지 약  $10^{-12} \text{ M}$ ; 또는 약

$10^{-12}$  M 내지 약  $10^{-13}$  M의 해리 상수( $K_D$ )를 갖는다.

- [0043] 또 다른 양태에서, 상기된 결합 단백질은 면역부착 분자, 이미징화 제제, 치료제 및 세포독성 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제제를 포함하는 접합체이다. 하나의 양태에서, 이미징화 제제는 방사선표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생발광 표지, 자기 표지 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 이미징화 제제는  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , 및  $^{153}\text{Sm}$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방사선표지이다. 또 다른 양태에서, 치료제 또는 세포독성 제제는 항 대사물, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관형성제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아포토시스 유발 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0044] 또 다른 양태에서, 상기된 결합 단백질은 결정화된 결합 단백질이고 결정으로서 존재한다. 하나의 양태에서, 결정은 담체 부재의 제어 방출 약제학적 결정이다. 또 다른 양태에서, 결정화된 결합 단백질은 당해 결합 단백질의 가용성 대응물보다 생체내에서 보다 큰 반감기를 갖는다. 또 다른 양태에서, 결정화된 결합 단백질은 생물학적 활성을 보유한다.
- [0045] 또 다른 양태에서, 상기된 결합 단백질은 당화된다. 예를 들어, 당화는 사람 당화 패틴이다.
- [0046] 본 발명의 한 측면은 상기된 결합 단백질중 임의의 하나를 암호화하는 분리된 핵산에 관한 것이다. 추가의 양태는 상기된 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공하고 이때, 벡터는 pcDNA; pTT (Durocher et al.(2002) Nucl. Acids Res. 30: 2); pTT3 (추가된 다중 클로닝 부위를 갖는 pTT); pEFBOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO; pEF6 TOPO; 및 pBJ으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 양태에서, 벡터는 미국특허공개 제2009/0239259에 기재된 벡터이다.
- [0047] 또 다른 측면에서, 숙주 세포는 상기된 벡터로 형질전환된다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 또 다른 양태에서, 숙주 세포는 이.콜라이(*E. coli*)이다. 관련 양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 또 다른 양태에서, 진핵 세포는 원생 생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균류 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 숙주 세포는 CHO, COS, NS0, SP2, PER.C6을 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유동물 세포; 또는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 진균류 세포 또는 Sf9와 같은 곤충 세포이다.
- [0048] 하나의 양태에서, 예를 들어, 상이한 특이성을 갖는 2개 이상의 DVD-Ig는 단일 재조합 숙주 세포에서 제조된다. 예를 들어, 항체 혼합물의 발현은 Oligoclones™(Merus B.V., The Netherlands)라고 불린다(미국 특허 제 7,262,028호; 제7,429,486호).
- [0049] 본 발명의 또 다른 측면은 상기된 숙주 세포중 임의의 하나를 결합 단백질을 생산하기에 충분한 조건하에 배양 배지에서 배양함을 포함하는, 상기된 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 당해 방법에 의해 제조되는 결합 단백질중 50% 내지 75%는 이원 특이적 4가 결합 단백질이다. 특정 양태에서, 당해 방법에 의해 제조되는 결합 단백질중 75% 내지 90%는 이원 특이적 4가 결합 단백질이다. 특정 양태에서, 제조되는 결합 단백질중 90% 내지 95%는 이원 특이적 4가 결합 단백질이다.
- [0050] 하나의 양태는 결합 단백질 방출용 조성물을 제공하고 이때 당해 조성물은 상기된 바와 같은 결정화된 결합 단백질 및 성분 및 하나 이상의 중합 담체를 포함하는 제형을 포함한다. 예를 들어, 중합 담체는 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(데프시펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프롤락톤), 폴리(디옥사논); 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(하이드록시프로필) 메타크릴아미드, 폴리[(오르가노)포스파젠], 폴리(오르토에스테르), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 플루론산 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 황화 폴리에아카라이드, 이의 블렌드 및 공중합체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 중합체를 포함한다. 예를 들어, 당해 성분은 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락티톨, 젤라틴, 하이드록시프로필- $\beta$ -사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 양태는 상기된 유효량의 조성물을 포유동물에게 투여함을 포함하는, 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명은 또한 상기된 바와 같은 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 추가의 양태에서, 약제학적 조성물은 장애헌을 치료하기 위한 하나 이상의 추가의 치료제를 포함한다.

예를 들어, 추가의 제제는 치료제, 이미지화제, 세포독성 제제, 혈관형성 억제제 (항-VEGF 항체 또는 VEGF-트랩을 포함하지만 이에 제한되지 않음); 키나제 억제제 (KDR 및 TIE-2 억제제를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 공동 자극 분자 차단제(항-B7.1, 항-B7.2, CTLA4-Ig, 항-CD20을 포함하지만 이에 제한되지 않음); 부착 분자 차단제(항-LFA-1 항체, 항-E/L 셀렉틴 항체, 소분자 억제제를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능성 단편(항-IL-18, 항-TNF, 항-IL-6/사이토킨 수용체 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않음); 메토틱세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제, 마약류 비스테로이드 소염 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항 미생물성 제제, 건선치료제, 코르티코스테로이드, 동화작용 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역억제제, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사선 약제, 항우울증제, 항정신병제, 자극제, 천식 약물, 베타 효능제, 흡입 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토킨 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0052]

또 다른 측면에서, 본 발명은 상기된 결합 단백질을 사람 피검체에 투여하여 사람 피검체내 표적 또는 표적들의 활성이 억제되어 치료가 달성됨을 포함하는, 상기된 결합 단백질이 결합할 수 있는 표적 또는 표적들이 해로운 장애를 앓는 사람 피검체를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 장애는 관절염, 골관절염, 연소성 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절증, 전신 홍반성 낭창, 크론 질환, 대장염, 장 염증 질환, 인슐린 의존성 진성 당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기성 질환, 건선, 피부경화증, 이식편 대 숙주 질환, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역 질환, 유육종증, 동맥경화증, 파종성 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브병, 신증후군, 만성 피로 증후군, 베게너 육아종증, 헤노흐-쇼렌라인 자반증, 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질환, 기생충 질환, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 횡단성 척수염, 헌팅톤 무도병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌졸중, 원발성 담즙성 간경변, 용혈성 빈혈, 악성 종양, 심부전증, 심근경색, 애디슨병, 산발성 질환, 다분비선 제I형 결핍증 및 다분비선 제II형 결핍증, 슈미트 증후군, 성인성(급성) 호흡 곤란 증후군, 탈모증, 원형 탈모증, 혈청반응 음성 관절증, 관절증, 라이터병, 건선성 관절증, 폐양성 대장염성 관절증, 클라미디아증, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절증, 척추관절증, 죽종 질환/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 질환, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 유천포창, 선상 IgA 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 크롬즈 양성 용혈성 빈혈, 후천성 악성 빈혈, 연소성 악성 빈혈, 근통성 뇌염/로알 프리(Royal Free) 질환, 만성 점막 피부 칸디다증, 거세포 동맥염, 원발성 경화성 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍 질환 증후군, 후천성 면역결핍 관련 질환, B형 간염, C형 간염, 공통 가변성 면역결핍증(공통 가변성 감마글로불린저혈증), 확장형 심근증, 여성 불임증, 난소 부전증, 조숙 난소부전, 섬유성 폐 질환, 잠복성 섬유조직 폐포염, 후-염증성 간질성 폐질환, 간질성 폐렴, 결합 조직 질환 관련 간질성 폐 질환, 조합성 결합 조직 질환 관련 폐 질환, 전신성 경화증 관련 간질성 폐 질환, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐 질환, 전신 홍반성 낭창 관련 폐 질환, 피부근염/다발성 근염 관련 폐 질환, 쇼그렌 질환 관련 폐 질환, 강직성 척추염 관련 폐 질환, 혈관염 범발성 폐 질환, 혈철증 관련 폐 질환, 약물-유도된 간질성 폐 질환, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐색성 세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤성 폐 질환, 감염후 간질성 폐 질환, 통풍성 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염(전형적 자가면역 또는 루포이드 간염), 2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당증, 흑색 극세포종에 따른 B형 인슐린 저항성, 부갑상선 기능저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역 질환, 기관 이식과 관련된 만성 면역 질환, 골관절증, 원발성 경화성 담관염, 1형 건선, 2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면역 호중구감소증, 신장 질환 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원판양 홍반성 낭창, 남성 불임증 특발증 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발성 경화증(모든 아형), 교감성 안염, 결합 조직 질환에 속발성인 폐 고혈압증, 구드패스튜어 증후군, 결절성 다발성 동맥염의 폐 징후, 급성 류마티스성 열, 류마티스성 척추염, 스틸씨 병, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야스 병/동맥염, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소증, 자가면역 갑상선 질환, 갑상선 기능항진증, 갑상선종증 자가면역 갑상선 기능저하증(하시모토 병), 위축성 자가면역 갑상선 기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간 질환, 만성 간 질환, 알콜성 경변, 알콜 유도 간 손상, 콜레오사타티스(choleostatis), 특이체질성 간 질환, 약물 유도 간염, 비알콜성 지방간염, 알레르기 및 천식, B 그룹 스트렙토코커스(streptococci) (GBS) 감염, 정신 장애(예를 들어, 우울증 및 정신분열증), Th2 형 및 Th1 형 매개 질환, 급성 및 만성 통증(상이한 형태의 통증), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암종 및 조혈 악성종양(백혈병 및 림프종), A베타지방단백질혈증, 말초청색증, 급성 및 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프성모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전증, 선암종, 공기 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알콜 유도 간염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 접촉 피부염, 알레

르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍, 근위축성 측삭 경화증, 빈혈, 앵기나 협심증, 전각 세포 퇴화, 항 cd3 치료, 항 인지질 증후군, 항-수용체 과민성 반응, 대동맥 및 말초 결찰증, 대동맥 해부, 동맥 고혈압, 동맥경화증, 동정맥 누공, 운동실조증, 심방세동 (지연 또는 발작성), 심방조동, 동정맥 막힘, B 세포 림프종, 골 이식 거부, 골수 이식 (BMT) 거부, 좌각차단, 버키트 림프종, 화상, 심장성 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 중양, 심근증, 심폐 우회 염증 반응, 연골 이식 거부, 소뇌피질 퇴화, 소뇌 장애, 혼란 또는 다초점 심방 빈맥, 화학치료 관련 장애, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 알콜증, 만성 염증 병리, 만성 림프성 백혈병 (CLL), 만성 폐쇄 폐 질환(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 결장직장 암증, 울혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐 심장, 관상 동맥 질환, 크루츠펠트-자콕(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 배양 음성 패혈증, 낭성유증, 사이토 킨 치료 관련 장애, 권투선수치매(Dementia pugilistica), 탈수초성질환, 땀기 출혈열, 피부염, 피부학적 증상, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환(diabetic atherosclerotic disease), 광범위 루이체 질환, 확장성 울혈성 심근증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군, CNS 도파민 수용체 차단 약물에 의해 유도된 약물 유도 운동 장애, 약물 과민증, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비질환, 후두개염, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 피부홍통증, 추체외로 및 소뇌 장애, 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 태아 흡선 이식 거부, 프리드리히 운동 실조증, 기능성 말초 동맥 장애, 진균류 패혈증, 가스괴저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 기관 또는 조직 이식 거부, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 모발 세포 백혈병, 할레르덴-스파츠 질환(Hallerrorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염, 고초열, 심장 이식 거부, 혈액소증, 혈액투석, 용혈성 요독증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증, 출혈, 간염(A), 히스 다발 부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨 질환, 과운동성 장애, 과민성 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동 부족 장애, 시상하부-뇌하수체-부신피질계 평가, 특발성 애디슨 질환, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개 세포독성, 무력증, 유아 척추 근육 위축증, 대동맥 염증, 인플루엔자 A, 이온화 방사선 노출, 홍채섬모체염/자궁염/광학적 신경근염, 허혈 관류 손상, 허혈 뇌졸중, 연소성 류마티스 관절염, 연소성 척추 근육 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부, 레지오넬라, 리슈마니아증, 나병, 피질척수계 병변, 지방부종, 간 이식 거부, 림프피부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 뇌막염, 수막염 균혈증, 대사/특발성, 편두통, 미토콘드리아 다중 시스템 장애, 복합 연결 조직 질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발성 골수종, 다발성 시스템 퇴화(만셀 데제린-토마스 쉬-드라거 및 마차도-조셉), 중증 근무력증, 세포내 마이코박테리움 감염증, 마이코박테리움 결핵, 골수이형성증후군, 심근 경색, 심근 허혈 장애, 비인두 암증, 신생아 만성 폐 질환, 신염, 신증, 신경퇴행성 질환, 신경성 I 근육 위축증, 호중구감소성 발열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 지류 폐색, 폐색성 동맥 질환, okt3 치료, 고환염/부고환염, 고환염/절관절제술 반전 과정, 기비대, 골다공증, 췌장 이식 거부, 췌장 암증, 부수종양성 증후군/악성 고칼슘혈증, 부갑상선 이식 거부, 골반 염증 질환, 다년성 비염, 심막 질환, 말초 동맥경화 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군 (다발신경병증, 장기비대, 내분비질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군, MI 후 심장절개 증후군, 자간전증, 전진적 상핵 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 치료, 레이노드 현상 및 질환, 레이노드 질환, 레프섬 질환, 일반 협소 QRS 심근증, 신혈관성고혈압, 재관류 손상, 제한성 심근병증, 육종, 피부경화증, 노인 무도병, 루이체형 노인성 치매, 혈청음성 관절병증, 쇼크, 겸상적혈구 빈혈증, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부, 고형 종양, 특이적 부정맥, 척수운동실조, 척수소뇌 퇴화, 스트렙토코커스 근염, 소뇌 구조적 병변, 아급성 경화성 범뇌염, 실신, 심혈관계 매독, 전신 아나필락시스, 전신 염증 반응 증후군, 전신 개시 연소성 류마티스 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 말초혈관 확장증, 폐색성 혈전 혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식, 외상/출혈, III형 과민성 반응, IV형 과민성, 불안정 앵기나, 요독증, 요로패혈증, 두드러기, 승모판 심장 질환, 하지 정맥, 혈관염, 정맥동 질환, 정맥종 혈전증, 심실 세동, 바이러스 및 진균류 감염, 바이탈 뇌염/무균성 수막염, 바이탈-연관 적혈구식작용 증후군, 웨른니케-코르사코프 증후군, 윌슨 질환, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부, 급성 관상 증후군, 급성 특발성 다발신경근염, 급성 염증 신경근병증, 급성 허혈, 성인 스틸스 질환, 원형탈모증, 아나필락시스증(anaphylaxis), 항-인지질 항체 증후군, 재생불량성빈혈, 동맥경화증, 아토피성 습진, 아토피성 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염과 관련된 자가면역 장애, 자가면역 장 병증, 자가면역 난청, 자가면역 림프구증식성 증후군 (ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 미성숙 난소 부전증, 안건염, 기관지확장증, 수포성 유천포창, 심혈관 질환, 악성 항인지질 증후군, 셀리악 질환(celiac disease), 경추 척추증, 만성 허혈, 반흔성 유천포창, 다발성 경화에 대한 위험을 갖는 임상적으로 분리된 증후군(cis), 결막염, 유년기 개시 정신성 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 누낭염, 피부근염, 당뇨 망막증, 진성 당뇨병, 요추간판탈출증, 추간관내장증, 약물 유도 면역 용혈성 빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 내안구염, 결공막염, 다형홍반, 중증 다형홍반, 임신성 유천포창, 길레인 바레 증후군(Guillain-Barre syndrome) (GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨 질환, 특발성 간질 폐렴, IgE-매개 알레르기, 면역 용혈성 빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구 염증 질환, 염증 수초탈락 질환, 염증 심장 질환, 염증 신장 질환, IPF/UIP, 홍채염, 각

막염, 건성각결막염, 쿠스마울 질환 또는 쿠스마울-마이어 질환, 란드리 마비, 랑게르한스 세포 조직구증, 열성 홍반(livedo reticularis), 황반변성, 미시적 혈관염, 경직성 척추염, 운동 뉴런 장애, 점막 유착포창, 다발성 기관 부전증, 중증 근무력증, 골수이형성증, 심근염, 신경근 장애, 신경병증, 비-A 비-B 간염, 시신경염, 골용해, 난소암, 소수관절 JRA, 말초 동맥 폐색성 질환 (PAOD), 말초 혈관 질환 (PVD), 말초 동맥 질환 (PAD), 정맥염, 결절성 다발 동맥염 (또는 결절성 동맥주위염), 다발연골염, 측두동맥염, 회색질척수염, 다발성 관절 JRA, 다발성 내분비 결핍 증후군, 다발성근염, 류마티스성 다발성 근육통 (PMR), 펌프 후 증후군, 1차 파킨슨병, 전립선 및 직장암 및 조혈 악성 (백혈병 및 림프종), 전립선염, 순수적혈구 저형성증, 1차 부신 부전증, 재발성 시속신경근염, 협착증, 류마티스 심장 질환, 사포 (활막염, 여드름, 농포증, 및 골염), 피부경화증, 2차 아밀로이드증, 폐 쇼크, 상공막염, 좌골신경통, 2차 부신 부전증, 실리콘 관련 연결 조직 질환, 스네돈-윌킨슨 (sneddon-wilkinson) 피부증, 강직성 척추염, 스티븐-존슨 증후군 (SJS), 전신 염증 반응 증후군, 일시적 동맥염, 톡소플라스믹 망막증, 독성 표피 괴사, 횡단척수염, TRAPS (중양 괴사 인자 수용체, 1형 알레르기 반응, II형 당뇨병, 두드러기, 통상의 간질 폐렴 (UIP), 혈관염, 춘계각결막염, 바이러스 망막염, 보그트-고야나기-하라다 (Vogt-Koyanagi-Harada) 증후군 (VKH 증후군), 습윤 황반 퇴화, 상처 치료, 관절병증과 관련된 여시니아 및 살모넬라 증이다.

[0053] 하나의 양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료되거나 진단되는 질환은 원발성 및 전이성 암을 포함하지만 이에 제한되지 않고 당해 암은 유방암, 결장암, 직장암, 폐암, 구인두암, 두경부암, 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 방광암 및 담관암, 소장암, 노관암(신장암, 방광암 및 요상피암을 포함), 여성 생식관암 (경부암, 자궁암 및 난소암, 및 융모막상피종 및 생식 융모상피성 질환), 남성 생식관암 (전립선암, 저정낭암, 고환암 및 생식 세포 종양을 포함), 내분비선암 (갑상선암, 부신암 및 뇌하수체암을 포함), 및 피부암, 및 혈관종, 흑색종, 육종 (골 기원 암 및 연조직 기원의 암 및 카포시 육종을 포함), 뇌암, 신경암, 안구암, 및 수막암 (정상세포종, 신경아교종, 아교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 양성종양, 및 수막종을 포함), 조혈 악성 종양으로 유래되는 고형 종양, 예를 들어, 백혈병 및 림프종(호지킨 및 비호지킨 림프종 둘다)를 포함한다.

[0054] 하나의 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는, 단독으로 사용되는 경우 또는 방사선치료 및/또는 기타 화학치료제와 병용하여 사용되는 경우, 암을 치료하거나 본원에 기재된 종양 기원의 전이의 예방 또는 억제에 사용된다.

[0055] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기된 결합 단백질중 임의의 하나를 상기 논의된 바와 같은 제2 제제의 투여 전 후 또는 동시에 투여하는 단계를 포함하는, 장애를 앓는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 제2 제제는 부데노사이드, 상피 성장 인자, 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 설파살라진, 아미노살리실레이트, 6-머캅토피린, 아자티오프린, 메트로니다졸, 리폭시게나제 억제제, 메살라민, 올살라진, 발살라지드, 항산화제, 트롬복산 억제제, IL-1 수용체 길항제, 항-IL-1 $\beta$  mAb, 항-IL-6 또는 IL-6 수용체, 성장 인자, 엘라스타제 억제제, 피리디널-이미다졸 화합물, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13 IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF의 항체 또는 효능제, CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 이의 리간드의 항체, 메토크세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린 제제, IRAK, NIK, IKK, p38, MAP 키나제 억제제, IL-1 $\beta$  전환 효소 억제제, TNF  $\alpha$  전환 효소 억제제, T-세포 시그널 전달 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토킨 수용체, 가용성 p55 TNF 수용체, 가용성 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, 소염 사이토킨, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF $\beta$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0056] 특정 양태에서, 상기된 약제학적 조성물은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복강내, 낭내, 연골내, 강내, 세포내, 소뇌내, 소뇌심실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 일시주사, 질내, 직장, 협측, 설하, 비내 및 경피투여로부터 선택되는 하나 이상의 방식으로 피검체에게 투여된다.

[0057] 본 발명의 한 측면은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질에 대한 하나 이상의 항-이디오타입 항체를 제공한다. 항-이디오타입 항체는 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합부의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 골격 영역 또는 본 발명의 결합 단백질에 도입될 수 있는 이의 일부에 제한되지 않지만 이와 같은 하나 이상의 면역글로불린 분자 부분을 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩타이드를 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1a는 이원 가변 도메인(DVD)-Ig 작제물을 도시하고 2개의 모 항체 기원의 DVD-Ig의 제조 전략을 보여준다.
- 도 1b는 작제물 DVD1-Ig, DVD2-Ig, 및 하이브리도마 클론 2D13.E3 (항-IL-1 $\alpha$ ) 및 13F5.G5 (항-IL-1 $\beta$ ) 기원의 2개의 키메라 단일특이적 항체를 도시한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 본 발명은 2개 이상의 항원에 결합하는 다가 및/또는 다특이적 결합 단백질에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 DVD-Ig를 제조하기 위한 핵산, 제조할 발현 벡터 및 숙주 세포 뿐만 아니라 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig)에 관한 것이다. 시험관내 또는 생체내에서 특이적 항원을 검출하기 위한 본 발명의 DVD-Ig를 사용하는 방법이 또한 본 발명에 포함된다.
- [0060] 본 명세서에서 다른 표시가 없는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 및 기술적 용어들은 당업자가 통상적으로 알고 있는 의미를 갖는다. 그러나 용어의 의미 및 범위는 임의의 잠재적인 모호성의 경우, 임의의 사전적 또는 외적인 정의에 대해 사전에 제공된 정의로서 명백해야만 한다. 또한, 정황상 다른 필요가 없는 한, 용어의 단수적 표현은 복수도 포함하며, 복수적 표현은 단수도 포함하는 것이다. 본 명세서에서, "또는"은 다른 표시가 없는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, "포함하는" 및 이러한 유형어, 예컨대 "포함한다" 및 "포함한"의 용어의 사용은 제한적 의미가 아니다. 또한, "원소" 또는 "성분" 등의 용어도 다른 구체적 표현이 없는 한, 1 유니트를 포함하는 원소 및 성분은 물론 하나 이상의 서브유니트를 포함하는 원소 및 성분들도 포함한다.
- [0061] 일반적으로, 본 명세서에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질과 핵산 화학 및 하이브리드화 등과 관련하여 사용된 용어들은 당업계에 공지되어 있고 공통적으로 사용되는 것이다. 본 발명의 방법 및 기술은 당업계에 공지되어 있고, 다른 표시가 없는 한 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 각종 일반 서적 및 구체적인 문헌들에 기술된 바와 같은 통상의 방법에 따라 일반적으로 수행된다. 효소 반응 및 정제 기술은 당업계에서 공통적으로 수행되거나 본 명세서에 기술된 바와 같이 제조자의 지침에 따라 수행한다. 본 명세서에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학 및 약제 화학과 관련하여 사용된 용어 및 그 실험 절차 및 기술은 당업계에 공지되어 일반적으로 사용되는 것이다. 화학 합성, 화학 분석, 약제, 제형, 전달 및 환자 치료에 대해서도 표준 기술을 사용한다.
- [0062] 본 발명을 더 용이하게 이해할 수 있도록 이하에 사용된 용어들의 정의를 정리했다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 "폴리펩타이드"란 용어는 아미노산의 임의의 중합체쇄를 의미한다. "펩타이드" 및 "단백질"이란 용어는 폴리펩타이드란 용어와 혼용할 수 있는 것으로서, 이 역시 아미노산의 중합체쇄를 의미한다. "폴리펩타이드"란 용어는 천연 또는 합성 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단량체 또는 중합체일 수 있다. 본원의 "폴리펩타이드"의 사용은 본문에서 달리 언급되지 않는 경우 폴리펩타이드 및 이의 단편 및 변이체(변이체의 단편을 포함하여)를 포괄하는 것으로 의도된다. 항원성 폴리펩타이드에 대해, 폴리펩타이드의 단편은 임의로 폴리펩타이드의 하나 이상의 연속 또는 비선형 에피토프를 함유한다. 하나 이상의 에피토프 단편의 정확한 경계는 당업계의 통상의 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 당해 단편은 약 5개 이상의 연속 아미노산, 예를 들어, 약 10개 이상의 연속 아미노산, 약 15개 이상의 연속 아미노산 또는 약 20개 이상의 연속 아미노산을 포함한다. 폴리펩타이드의 변이체는 본원에 기재된 바와 같다.
- [0064] "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩타이드"란 용어는 그 기원이나 파생 급원에 따라서 자연 상태일 때 동반되던 자연 관련 성분과 관련되어 있지 않은 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 즉, 동일한 종 유래의 다른 단백질이 실질적으로 없고; 다른 종 유래의 세포에 의해서 발현되거나; 자연에서 발생되지 않는 것이다. 즉, 자연적으로 생성하는 세포와 다른 세포 시스템에서 합성되거나 화학적으로 합성된 폴리펩타이드는 이의 자연 관련 성분에서 "분리된" 것이다. 또한, 단백질은 당업계에 공지된 단백질 정제 기술을 사용하여 분리를 통해 자연 관련 성분으로부터 실질적으로 유리될 수도 있다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 "회수하는"이란 용어는 당업계에 공지된 단백질 정제 기술 등을 사용하여 분리에 의해 자연 관련 성분이 실질적으로 제거된 폴리펩타이드와 같은 화학종을 제공하는 과정을 의미한다.
- [0066] 본원에 사용된 바와 같은 "생물학적 활성"은 항원의 모든 고유 생물학적 성질을 언급한다(생체내에서 발견되는 바와 같이 천연에 존재하든 또는 재조합 수단에 의해 제공되거나 가능한 경우이든지간에 상관없이). 생물학적

성질은 수용체로의 결합; 세포 증식의 유도, 세포 성장의 억제, 기타 사이토킨의 유도, 아포토시스의 유도 및 효소 활성을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0067] 항체, 단백질 또는 펩타이드의 제2 화학종과의 상호작용과 관련하여 본 명세서에 사용된 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이란 용어는 그 상호작용이 화학종 상의 특정 구조(예컨대, 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 따라 이루어진다는 것을 의미한다. 예컨대, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하여 여기에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적이라면, 표지된 "A"와 항체를 포함하는 반응에서 에피토프 A(또는 유리된 미표지 A)를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0068] 본 명세서에 사용된 "항체"란 용어는 4개의 폴리펩타이드 체, 즉 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)로 구성된 임의의 면역글로불린(Ig) 분자 또는 이러한 Ig 분자의 필수적인 에피토프 결합 특징을 갖는 임의의 기능성 단편, 돌연변이체, 변형체 또는 유도체를 의미한다. 이러한 돌연변이체, 변형체 또는 유도체 항체형은 당업계에 공지되어 있다. 이의 구체예에 대해서는 이하에 논의되나, 이에 국한되지는 않는다.

[0069] 완전한 항체에서, 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 약어로 HCVR 또는 VH로 표시됨)과 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서 약어로 LCVR 또는 VL로 표시됨)과 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 다시 상보성 결정 영역(CDR)이라 불리는 초가변성 영역들로 나뉘 수 있고, 여기에는 골격 영역(FR)이라는 더 보존적인 영역들이 산재되어 있다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 이들은 아미노 말단에서 카복시 말단으로 다음과 같은 순서에 따라 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다.

[0070] 용어 "Fc 영역"은 온전한 항체의 파파인 분해에 의해 생성될 수 있는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. Fc 영역은 고유 서열 Fc 영역 또는 변이 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 항체 이펙터 기능을 변경시키기 위한 Fc부 내의 아미노산 잔기의 치환은 당업계에 공지되어 있다(미국 특허 제5,648,260호 및 제5,624,821호). 항체의 Fc 부는 여러 중요한 이펙터 기능, 예컨대 사이토킨 유도, ADCC, 식세포작용, 보체 의존적 세포독성(CDC) 및 항체와 항원-항체 복합체의 반감기/제거율 등을 매개한다. 몇몇 경우에는 이러한 이펙터 기능이 치료 항체에 바람직하지만, 어떤 다른 경우에는 치료 목적에 따라서 불필요하거나 심지어 유해할 수도 있다. 특정 사람 IgG 아이소타입, 구체적으로 IgG1 및 IgG3은 각각 FcγR 및 보체 C1q에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 매개한다. 신생 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 혈행 반감기를 결정하는 중요한 성분이다. 또 다른 양태에서는, 항체의 불변 영역, 예컨대 항체의 Fc 영역에 존재하는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 치환되어 이펙터 기능이 변경된 항체가 제공된다. 면역글로불린의 2개의 동일한 중쇄의 이량체화는 CH3 도메인의 이량체화에 의해 매개되고 힌지 영역내에서 디설파이드 결합에 의해 안정화된다(문헌참조: Huber et al. (1976) Nature 264: 415-20; Thies et al. (1999) J. Mol. Biol. 293: 67-79). 중쇄-중쇄 디설파이드 결합을 방지하기 위한 힌지 영역내 시스테인 잔기의 돌연변이는 CH3 도메인의 이량체화를 불안정화시킬 것이다. CH3 이량체화에 관여하는 잔기들은 동정되었다(문헌참조: Dall'Acqua (1998) Biochem. 37: 9266-73). 따라서, 1개의 반쪽 Ig를 생성시킬 수 있다. 흥미롭게도, 이들 1개의 반쪽 Ig 분자는 IgG 및 IgA 서브클래스 둘다에 대해 천연에서 발견되었다(문헌참조: Seligman (1978) Ann. Immunol. 129: 855-70; Biewenga et al. (1983) Clin. Exp. Immunol. 51: 395-400). FcRn: Ig Fc 영역의 화학양론은 2:1인 것으로 측정되었고(문헌참조: West et al. (2000) Biochem. 39: 9698-708), 반쪽 Fc는 FcRn 결합을 매개하기에 충분하다(문헌참조: Kim et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 542-548). CH3 이량체화에 중요한 잔기가 CH3 베타 쉬트 구조의 내부 접지면상에 존재하는 반면에, FcRn 결합에 관여하는 영역이 CH2-CH3 도메인의 외부 접지면상에 존재하기 때문에, CH3 도메인의 이량체화를 붕괴시키기 위한 돌연변이는 FcRn 결합에 대해 큰 역효과를 나타내지 않을 수 있다. 그러나, 반쪽-Ig 분자는 통상의 항체 크기에 비하여 작기 때문에 조직 침투에 있어서 특정 잇점들을 가질 수 있다. 하나의 양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 본 발명의 결합 단백질의 불변 영역, 예를 들어, Fc 영역에서 치환되어 중쇄의 이량체화가 붕괴되어 반쪽 DVD Ig 분자가 생성된다. IgG의 항-염증 활성은 IgG Fc 단편의 N-연결된 글리칸의 시알화에 완전히 의존한다. 항-염증 활성에 대한 정확한 글리칸 요건을 결정하여 적당한 IgG1 Fc 단편을 생성할 수 있어 효능이 크게 개선된 완전한 재조합 시알화된 IgG1 Fc를 제조할 수 있다(문헌참조: Anthony, R.M., et al. (2008) Science 320:373-376).

[0071] 본 명세서에 사용된 항체의 "항원 결합부"(또는 간단히 "항체부")란 용어는 항원에 대한 특이적 결합능을 갖는 하나 이상의 항체 단편을 의미한다. 항체의 항원 결합 기능은 완전한 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으

로 밝혀져 있다. 이러한 항체 양태들은 또한 이특이적, 이중특이 또는 다중특이 형일 수 있으며, 즉 2개 이상의 다른 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 항체의 "항원 결합부"라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 2개의 Fab 단편이 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 결합되어 있는 이가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체 한쪽 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 하나의 가변 도메인을 포함하는 dAb 단편(Ward (1989) Nature 341: 544-546; PCT 공보 WO 90/05144 A1); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 두 도메인, VL 및 VH는 다른 유전자에 의해 암호화되지만, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 일가 분자(일본쇄 Fv(scFv)로 알려진 것; 예컨대 Bird et al.(1998) Science 242: 423-426; 및 Huston et al.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)를 형성하고 있는 단일 단백질 쇄로서 제조될 수 있게 하는 합성 링커를 이용하여 VL 및 VH 영역은 제조방법으로 결합될 수 있다. 이러한 단일쇄 항체는 항체의 "항원 결합부"라는 용어에도 포함되는 것으로도 간주된다. 단일쇄 항체의 다른 형태, 예컨대 이중항체(diabody)도 포함된다. 이중항체는 일본쇄 폴리펩타이드에서 VH 및 VL 도메인이 발현되지만, 동일 쇄 상의 두 도메인 사이에 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 상기 도메인들이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 2가의 이특이적 항체이다(예컨대, Holliger, P., et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al.(1994) Structure 2: 1121-1123). 이러한 항체 결합부는 당업계에서 공지되어 있다(문헌참조: Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)). 추가로, 단일쇄 항체는 또한 상보적 경쇄 폴리펩타이드와 함께 한쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한쌍의 텐덤 Fv 절편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체"를 포함한다(문헌참조: Zapata et al.(1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062; 및 미국 특허 제 5,641,870호).

[0072] 용어 "다가 결합 단백질"은 본원 명세서 전반에 걸쳐 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 지칭하는데 사용된다. 하나의 양태에서, 다가 결합 단백질은 바람직하게 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 가공되고 일반적으로 천연 항체가 아니다. 용어 "다특이적 결합 단백질"은 2개 이상의 관련 또는 비관련 표적에 결합하는 결합 단백질을 언급한다. 본 발명의 이원 가변 도메인 (DVD) 결합 단백질은 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하고 4가 또는 다가의 결합 단백질이다. DVD는 즉, 하나의 항원에 결합하는 1특이적이거나 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 다특이적일 수 있다. 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하는 DVD 결합 단백질은 DVD Ig로 언급된다. DVD Ig의 각 반쪽은 하나의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 하나의 경쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 각각의 결합 부위는 항원 결합 부위당 항원 결합에 관여하는 총 6개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이특이적 항체"는 퀴드로마 기술 (문헌참조: Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983) Nature 305(5934): p. 537-540), 2개의 상이한 모노클로날 항체의 화학적 접합 (문헌참조: Staerz, U.D. et al. (1985) Nature 314(6012): 628-631), 또는 Fc 영역에 돌연변이를 도입하는 크롭 인투 홀 또는 유사한 방법(문헌참조: Holliger, P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 (14): 6444-6448)에 의해, 다중의 상이한 면역글로빈 중(이중에 하나만이 작용성 이특이적 항체이다)을 생성시킴으로써 제조되는 완전한 길이의 항체를 언급한다. 분자 기능에 의해, 이특이적 항체는 이의 2개의 결합 암(한쌍의 HC/LC)중 하나상의 하나의 항원(또는 에피토프)에 결합하고 이의 2번째 암(다른 쌍의 HC/LC)상의 다른 항원(또는 에피토프)에 결합한다. 당해 정의에 따라, 이특이적 항체는 2개의 구분된 항원 결합 암(2개 특이성 및 CDR 서열로)을 갖고 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 1가이다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이원-특이적 항체"는 이의 결합 암(한 쌍의 HC/LC)의 각각에서 2개의 상이한 항원(또는 에피토프)와 결합할 수 있는 완전한 길이의 항체를 언급한다(문헌참조: PCT 공보 제WO 02/02773호). 따라서, 이원-특이적 결합 단백질은 동일한 특이성 및 동일한 CDR 서열을 갖는 2개의 동일한 항원 결합 암을 갖고 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 2가이다.

[0075] 결합 단백질의 "작용성 항원 결합 부위"는 표적 항원에 결합하는 부위이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 근본적으로 항원 결합 부위가 유래된 모 항체 만큼 강하지 않지만 항원에 결합하는 능력은 항원에 결합하는 항체를 평가하기 위해 공지된 다수의 방법중 임의의 하나를 사용하여 측정가능해야만 한다. 더욱이, 본원에서 다가의 항체의 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은 정량적으로 동일할 필요는 없다.

[0076] 용어 "사이토킨"은 세포간 매개체로서 다른 세포 집단에 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반적 용어이다. 당해 사이토킨의 예는 림포킨, 모노킨 및 통상적인 폴리펩타이드 호르몬이다. 사이토킨중에는 사람 성장 호르몬, N-메티오닐 사람 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐라신; 프로렐라신; 난포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및

항체 호르몬(LH)와 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타 물리리안 억제 물질; 마우스 생식선자극호르몬 관련 펩타이드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); NGF-알파와 같은 신경 성장 인자; 혈소판 성장 인자; TGF-알파 및 TGF-베타와 같은 형질전환 성장 인자 (TGF); 인슐린형 성장 인자-1 및 -11; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도성 인자; 인터페론-알파, -베타 및 -감마 콜로니 자극 인자(CSF)(예를 들어, 대식세포-CSF(M-CSF))와 같은 인터페론; 과립구 대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, 및 IL-33과 같은 인터류킨 (IL); TNF-알파 또는 TNF-베타와 같은 종양 괴사 인자; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 기타 폴리펩타이드 인자가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 사이토킨은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 증가물 기원의 단백질을 포함한다.

[0077] 용어 "링커"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드를 지칭하는데 사용되고 하나 이상의 항원 결합부를 연결하는데 사용된다. 당해 링커 폴리펩타이드는 문헌(참조: Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123)에 널리 공지되어 있다. 예시적인 링커는 AKTTPKLEEGEFSEAR (서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (서열번호 2); AKTTPKLGG (서열번호 3); SAKTTPKLGG (서열번호 4); SAKTTP (서열번호 5); RADAAP (서열번호 6); RADAAPTVS (서열번호 7); RADAAAAGGPGS (서열번호 8); RADAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> (서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV (서열번호 10); ADAAP (서열번호 11); ADAAPTIVSIFPP (서열번호 12); TVAAP (서열번호 13); TVAAPSVFIFPP (서열번호 14); QPKAAP (서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP (서열번호 16); AKTTPP (서열번호 17); AKTTPSVTLPLAP (서열번호 18); AKTTAP (서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP (서열번호 20); ASTKGP (서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP (서열번호 22), GGGSGGGSGGGGS (서열번호 23); GENKVEYAPALMALS (서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS (서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS (서열번호 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (서열번호 27); 및 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (서열번호 28)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0078] "면역글로불린 불변 도메인"은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 언급한다. 사람 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열은 당업계에서 공지되어 있다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 균질의 항체 집단으로부터 수득된 항체를 언급하고, 즉, 개개의 항체를 포함하는 집단은 최소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고 단일 항원에 대해 지시된 것이다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프들)에 대해 지시된 상이한 항체들을 포함하는 항체 집단과는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정 방법에 의해 항체 생성을 요구하는 것으로 해석되지 말아야 한다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "사람 항체"는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유래하는 가변 및 불변 영역을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 사람 항체는 예를 들어, CDR 및 특히 CDR3에서 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "사람 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 배선으로부터 유래하는 CDR 서열이 사람 골격 서열상으로 접목된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0081] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 사람 항체"는 재조합 수단에 의해 생성되거나, 발현되거나, 제작되거나 분리된 모든 사람 항체, 예를 들어, 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체(하기 섹션 II C에서 추가로 기재됨), 재조합, 조합된 사람 항체 라이브러리로부터 유래된 항체 (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunol. Today* 21:371-378), 사람 면역글로불린 유전자로 유전자 전이된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체 (Taylor, L. D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnol.* 13:593-597; Little M. *et al* (2000) *Immunol. Today* 21:364-370) 또는 사람 면역글로불린 유전자 서열을 기타 DNA 서열로 스플라이싱함을 포함하는 임의의 기타 수단에 의해 생성되거나 발현되거나 제작되거나 분리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 당해 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 특정 양태에서, 당해 재조합 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는 사람 Ig 서열로 유전자 전이된 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에

적용되고 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 유래하고 이와 관련된 것이지만 생체내 사람 항체 배선 레퍼토리내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0082] "친화성 성숙된" 항체는 하나 이상의 CDR에서 하나 이상이 변형되어 당해 변형된 것을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화성이 개선된 것이다. 바람직한 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화성을 갖는다. 친화성 성숙된 항체는 당업계에서 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌[참조: Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783]은 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화성 성숙화를 기재하고 있다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌[참조: Barbas, et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169: 147-155; Yelton et al., (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154(7): 3310-9; 및 Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896]에 기재되어 있고 활성 향상 아미노산 잔기를 이용한 선택적 돌연변이유발 위치, 접촉 또는 과돌연변이 위치에서의 선택적 돌연변이는 미국특허 제6,914,128호에 기재되어 있다.

[0083] "키메라 항체"란 용어는 한 종 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열과 다른 종 유래의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예컨대 쥐의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 사람 불변 영역에 결합된 항체를 의미한다.

[0084] "CDR 접목 항체"란 용어는 한 종에서 유래되는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, VH 및/또는 VL의 하나 이상의 CDR 영역의 서열들이 다른 종의 CDR 서열로 교체된 항체를 의미하는 것으로서, 예컨대 쥐의 CDR의 하나 이상(예컨대, CDR3)이 사람 CDR 서열로 교체된 쥐의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 보유한 항체가 있다.

[0085] "사람화된 항체"란 용어는 사람을 제외한 종(예컨대, 마우스) 유래의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만 VH 및/또는 VL 서열의 적어도 일부가 더 "사람다운", 즉 사람 배선 가변 서열과 더 유사한 서열로 변경된 항체를 의미한다. 사람화된 항체의 일 형태는 사람 CDR 서열이 대응하는 비사람 CDR 서열을 대신하기 위하여 비사람 VH 및 VL 서열로 도입된 CDR 접목 항체이다. 또한 "사람화된 항체"는 목적하는 항원과 면역특이적으로 결합하고 실질적으로 사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 골격(FR) 영역 및 실질적으로 비-사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 변이 유도체, 유사체 또는 이의 단편이다. CDR과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로"는 비-사람 항체 CDR과 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 언급한다. 사람화된 항체는 실질적으로 하나 이상 및 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv)를 포함하고 여기서, CDR 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 비-사람 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 CDR에 상응하고 골격 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 사람 면역글로불린 컨센서스 서열의 CDR이다. 하나의 양태에서, 사람화된 항체는 또한 사람 면역글로불린의 전형적인 영역인 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 하나 이상의 부분을 포함한다. 몇몇 양태에서, 사람화된 항체는 적어도 중쇄의 가변 도메인 뿐만 아니라 경쇄 둘다를 함유한다. 당해 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 사람화된 항체는 사람화된 경쇄만을 함유한다. 몇몇 양태에서, 사람화된 항체는 사람화된 중쇄만을 함유한다. 특정 양태에서, 사람화된 항체는 경쇄 및/또는 사람화된 중쇄의 사람화된 가변 도메인만을 함유한다.

[0086] 용어 "캐뻛 번호", "캐뻛 정의" 및 "캐뻛 표지"는 상호교환적으로 본원에서 사용된다. 이러한 용어는 당해 분야에서 인지되며 항체 또는 이의 항원 결합부의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 다른 아미노산 잔기 보다 더 가변적인(즉, 초가변성) 아미노산 잔기의 번호를 매기는 시스템을 의미한다[Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 and, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]. 중쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 CDR1에 있어서 아미노산 31 내지 35 부위, CDR2에 있어서 아미노산 50 내지 65 부위, 및 CDR3에 있어서 아미노산 95 내지 102 부위의 범위이다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 CDR1에 있어서 아미노산 24 내지 34 부위, CDR2에 있어서 아미노산 50 내지 56 부위, 및 CDR3에 있어서 아미노산 89 내지 97 부위의 범위이다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CDR"은 항체 가변 서열내 상보성 결정 영역을 언급한다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역에는 3개의 CDR이 있고 가변 영역 각각에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 명명된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합하는 단일 가변 영역내 존재하는 3개의 CDR 그룹을 언급한다. 이들 CDR의 정확한 경계선은 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. 문헌[Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))]에 기재된 시스템은 항체의 임의의 가변 영역에 적용될 수 있는 명확한 잔기 번호매김 시스템을 제공할 뿐만 아니라 3개의 CDR을 한정하는 정확한 잔기 경계선을 제공한다. 이들 CDR은 캐뻛 CDR로서 언급될 수 있다. 문헌

[Chothia and coworkers (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 및 Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883)]에서는, 아미노산 서열 수준에서 다양성이 크다 할지라도 캐뱃 CDR내에 특정 아부위는 거의 동일한 펩타이드 골격 형태를 취하고 있음을 밝혔다. 이들 아부위는 L1, L2 및 L3 또는 H1, H2 및 H3으로서 명명되었고 여기서, "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 지칭한다. 이들 영역은 초티아 CDR로서 언급될 수 있고 이는 캐뱃 CDR과 중복되는 경계선을 갖는다. 캐뱃 CDR과 중복하는 CDR을 한정하는 또 다른 경계선은 문헌 [Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 및 MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45]에 기재되어 있다. 또 다른 CDR 경계선 한정에는 상기 시스템중 하나를 엄격하게 따르지는 않지만, 특정 잔기 또는 잔기 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 영향주지 않는다는 예측 또는 실험적 발견의 측면에서 이들이 단축되거나 연장될 수 있다 하더라도 캐뱃 CDR과 중복된다. 본원에 사용된 방법은 당해 시스템중 어느 하나에 따라 정의된 CDR을 사용할 수 있지만 바람직한 양태는 캐뱃 또는 초티아 한정된 CDR을 사용하는 것이다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "골격" 또는 "골격 서열"은 CDR을 제외한 가변 영역의 나머지 서열을 언급한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템에 의해 결정될 수 있기 때문에, 골격 서열의 의미는 이에 따라 상이하게 해석된다. 6개의 CDR (경쇄의 CDR-L1, -L2, 및 -L3 및 중쇄의 CDR-H1, -H2, 및 -H3)은 또한 경쇄 또는 중쇄상의 골격 영역을 각 쇄상에 4개의 서브-영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 나누고 여기서, CDR1은 FR1과 FR2 사이에 위치되고, CDR2는 FR2와 FR3 사이에 위치되고 CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치된다. FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 특정 서브-영역으로 특정화하는 것 없이 다르게 언급된 골격 영역은 단일의 천연 면역글로불린 쇄의 가변 영역내에 조합 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같은 FR은 4개의 서브-영역중 하나를 나타내고 FR들은 골격 영역을 구성하는 4개의 서브-영역중 2개 이상을 나타낸다.

[0089] 본원에 사용된 바와 같은, "배선 항체 유전자" 또는 "유전자 단편"은 특정 면역글로불린의 발현을 위해 유전학적 재배열 및 돌연변이를 유발하는 성숙 과정을 거치지 않는 비-립프성 세포에 의해 암호화된 면역글로불린 서열을 언급한다[Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv Exp Med Biol. 484:13-30]. 본 발명의 다양한 양태에 의해 제공되는 잇점중 하나는 배선 항체 유전자가 성숙 항체 유전자 보다 종에서 개체에 특징적인 필수 아미노산 서열을 보존할 가능성이 높음에 따라 당해 종에서 치료학적으로 사용되는 경우 외래 공급원으로서 인지될 가능성이 낮다는 사실에 기인한다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "중화"는 결합 단백질이 사이토킨에 특이적으로 결합하는 경우 사이토킨의 생물학적 활성을 중화시키는 것을 언급한다. 하나의 양태에서, 중화 결합 단백질은 사이토킨에 결합하여 약 20% 이상, 40% 이상, 60% 이상, 80% 이상 또는 85% 이상으로 사이토킨의 생물학적 활성을 감소시킨다.

[0091] 용어 "활성"은 2개 이상의 항원에 대한 DVD-Ig의 결합 특이성/친화성과 같은 활성을 포함한다.

[0092] "에피토프"란 용어는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합하는 임의의 폴리펩타이드 결정인자를 포함한다. 특정 양태에서, 에피토프 결정인자에는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐과 같은 분자의 화학적 활성 표면 기가 포함되고, 특정 양태에서는 특이적인 입체 구조 특징, 및/또는 특이적 하전 특징을 갖는 것일 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원의 일 영역이다. 따라서, 에피토프는 특이적 결합 파트너상의 상보적 부위에 결합하는 것으로 알려진 항원(또는 그 단편)의 영역의 아미노산 잔기로 이루어진다. 항원 단편은 1개 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 항체는 단백질 및/또는 거대분자의 배합 혼합물에서 자신의 표적 항원을 우선적으로 인식할 때 항원에 특이적으로 결합한다고 한다. 항체가 교차 경쟁(하나가 다른 하나의 결합 또는 조절 효과를 방해한다)하는 경우 항체는 "동일한 에피토프에 결합한다"라고 일컫는다. 추가로 에피토프의 구조적인 정의(중첩, 유사, 동일)는 유용하지만 기능적 정의는 흔히 이들이 구조적(결합) 및 기능적(조절, 경쟁) 파라미터를 포괄하기 때문에 보다 관련된다.

[0093] 본 명세서에 사용된 "표면 플라스몬 공명"이란 용어는 예를 들어, BIAcore® 시스템(BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ) 등을 이용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변경을 검출하여 생체특이적 상호작용을 실시간 분석할 수 있는 광학 현상을 의미한다. 이에 대한 상세한 설명은 문헌[Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., et al.(1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; 및 Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277]에 기술되어 있다.

[0094] 본 명세서에 사용된 " $K_{on}$ "이란 용어는 당업계에 공지된 바와 같이 항체/항원 복합체를 형성하기 위한 항원에 대한 결합 단백질(예를 들어, 항체)의 결합을 나타내는 온 레이트 상수(on rate constant)를 의미하는 것으로 간주한다. " $K_{on}$ "은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이 용어 "결합율 상수" 또는 " $k_a$ "로 공지되어

있다. 표적 항원에 대한 항체의 결합을 또는 항체와 항원간의 복합체 형성율을 지적하는 당해 값은 하기의 식으로 나타낸다:

[0095] 항체("Ab") + 항원 ("Ag")→Ab-Ag.

[0096] 본원에 사용된 바와 같은 용어 " $K_{off}$ "는 당업계에서 공지되어 있는 바와 같이, 예를 들어, 항체/항원 복합체로부터 결합 단백질(예를 들어, 항체)의 해리에 대한 오프 레이트 상수를 의미하는 것으로 간주한다. 또한, " $K_{off}$ "는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이 용어 "해리율 상수" 또는 " $k_d$ "로도 알려져 있다. 당해 값은 하기의 식에 나타난 바와 같이 시간 경과에 따라 Ab-Ag 복합체가 유리된 항체 및 항원으로 분리되거나 표적 항원으로부터의 항체의 해리율을 지적한다:

[0097]  $Ab + Ag \leftarrow Ab-Ag$ .

[0098] 본원에 상호교환적으로 사용된 용어들 "평형 해리 상수" 또는 " $K_D$ "는 평형에서의 적정 측정 또는 오프 속도 상수( $K_{off}$ )를 온 속도 상수( $K_{on}$ )으로 나누어 수득된 값을 언급하는 것으로 간주한다. 온 속도 상수, 오프 속도 상수 및 평형 오프 속도 상수는 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 나타내는데 사용된다. 온 속도 및 오프 속도 상수를 결정하기 위한 방법은 당업계에서 널리 공지되어 있다. 형광계 기술의 사용은 평형상태에서 생리학적 완충액중의 샘플을 조사하기 위해 높은 민감성 및 능력을 제공한다. 다른 실험 방법 및 장비, 예를 들어, BIAcore® (생분자 상호작용 분석) 분석을 사용할 수 있다((예를 들어, 제조원(BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden)으로부터 구입가능한 장비). 추가로, KinExA® (동력학 배척 분석) 분석(제조원: Sapidyn Instruments (Boise, Idaho))을 또한 사용할 수 있다.

[0099] "표지" 및 "검출가능한 표지"는 특이적 결합 파트너, 예를 들어, 항체 또는 분석물에 부착된 잔기를 의미하고 예를 들어, 당해 잔기는 항체 및 분석물과 같은 특이적 결합 쌍의 구성원간의 반응을 검출가능하게 하고 당해 표지된 특이적 결합 파트너, 예를 들어, 항체 또는 분석물은 "검출가능하게 표지된"것으로서 언급된다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 당해 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 동정을 위해 제공된 표지가 혼입된 단백질을 언급한다. 하나의 양태에서, 당해 표지는 가시적 또는 장치적 수단, 예를 들어, 방사선표지된 아미노산 및 마크된 아비딘(예를 들어, 광학적 또는 비색 측정 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소적 활성을 함유하는 스트렙타비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오틴 잔기의 폴리펩타이드로의 부착에 의해 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 검출가능한 마커이다. 폴리펩타이드에 대한 표지의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 방사선동위원소 또는 방사선헤종(예,  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{35}S$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{99}Tc$ ,  $^{111}In$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{177}Lu$ ,  $^{166}Ho$  및  $^{153}Sm$ ), 크로마젠, 형광 표지(예를 들어, FITC, 로다민 및 란타니드 포스포르스), 효소 표지(예, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스포타제); 화학발광 마커; 비오틴 기; 2차 리포터(예컨대, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인 및 에피토프 태그)에 의해 인지되는 소정의 폴리펩타이드 에피토프; 및 자성 제제, 예컨대 가돌리늄 킬레이트. 면역분석을 위해 통상적으로 사용되는 표지의 대표적 예는 빛을 생성시키는 잔기, 예를 들어, 아크리디늄 화합물, 및 형광을 생성하는 잔기, 예를 들어, 플루오레세인을 포함한다. 다른 표지는 본원에 기재되어 있다. 이와 관련하여 잔기 자체는 검출가능하게 표지될 수는 없지만 또 다른 잔기와 반응시 검출가능하게 될 수 있다. "검출가능하게 표지된"의 사용은 후자 유형의 검출가능한 표지를 포괄하는 것으로 간주된다.

[0100] "접합체"란 용어는 제2 화학 잔기, 예컨대 치료제 또는 세포독성제에 화학적으로 결합된 결합 단백질을 의미한다. 본 명세서에 사용된 "제제"라는 용어는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 의미한다. 하나의 양태에서, 치료제 또는 세포독성제는 백일해 독소, 탁솔, 시토크알라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미토코산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-테하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체가 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 면역분석에 사용되는 경우, 접합체 항체는 검출 항체로서 사용되는 검출가능하게 표지된 항체이다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "결정" 또는 "결정화된"은 결정 형태로 존재하는 결합 단백질(예: 항체) 또는 이의 항원 결합부를 의미한다. 결정은 고체 상태의 물질의 일 형태로서, 무정형 고체 상태 또는 액정 상태와 같은 다른 형태와 상이하다. 결정은 원자, 이온, 분자(예, 항체와 같은 단백질) 또는 분자 어셈블리(예, 항원/항체

복합체)의 규칙적이고 반복적인 입체 배열로 구성된다. 이러한 입체 배열은 당업계에서 공지된 특이적인 수학적 관계에 따라 배열된다. 결정 중에서 반복되는 기본 유니트 또는 빌딩 블록은 비대칭 유니트라 한다. 배열내 비대칭 유니트의 반복은 분명한 소정의 결정학적 대칭과 일치하게 하여 결정의 "유니트 셀"을 제공한다. 모든 3차원에서 규칙적 해독에 의한 유니트 셀의 반복은 결정을 제공한다[Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York (1999)].

[0102] "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 2개 이상의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 의미하는 것으로서, 리보뉴클레오타이드이거나 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 어느 한 뉴클레오타이드의 변형된 형태를 의미한다. 이 용어에는 일본쇄 및 이본쇄 표준 형태의 DNA가 포함된다.

[0103] 본 명세서에 사용된 "분리된 폴리뉴클레오타이드"란 용어는 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 게놈, cDNA 또는 합성 기원 또는 이의 일부 조합)를 의미하는데, 그 기원에 따라서, "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 자연에서 발견되는 "분리된 폴리뉴클레오타이드"의 폴리뉴클레오타이드 전부 또는 일부와 관련되어 있지 않거나, 자연에서는 결합되지 않았던 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 결합되거나; 또는 더 큰 서열의 일부로서 자연에서 발생되지 않는 폴리뉴클레오타이드이다.

[0104] "벡터"라는 용어는 결합된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미하는 것으로 간주한다. 벡터의 한가지 형태는 추가 DNA 분절이 결합될 수 있는 원형의 이본쇄 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 다른 형태의 벡터는 추가 DNA 분절이 바이러스 게놈에 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다(예컨대, 세균 복제 기원을 보유한 세균 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 다른 벡터(예컨대, 비에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입 시 숙주 세포의 게놈으로 통합될 수 있고, 이로써 숙주 게놈에 따라 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 작동적으로 결합된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본 명세서에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")라 한다. 일반적으로 재조합 DNA법에 유용한 발현 벡터는 흔히 플라스미드 형태이다. 본 명세서에 "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이기 때문에 대체되어 사용될 수 있다. 하지만, 본 발명은 등가 기능을 하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터도 포함한다.

[0105] "작동적으로 결합된"이란 용어는 기술된 성분이 의도한 방식으로 기능할 수 있는 관계에 있는 병치 상태를 의미한다. 암호 서열에 "작동적으로 결합된" 조절 서열은 암호 서열의 발현이 조절 서열에 적합한 조건 하에서 수행되도록 결합된다. "작동적으로 결합된" 서열에는 당해 유전자에 근접한 발현 조절 서열번호 및 당해 유전자를 조절하기 위하여 트랜스로 작용하거나 일정 거리에 있는 발현 조절 서열이 포함된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "발현 조절 서열"이란 용어는 이들이 결합된 암호 서열의 발현과 프로세싱을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 발현 조절 서열에는 적당한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 접목 및 폴리아데닐화 시그널과 같은 효과적인 RNA 프로세싱 시그널; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 해독 효율을 증강시키는 서열(즉, 코작 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 증강시키는 서열; 필요한 경우 단백질 분비를 증강시키는 서열번호 등이 포함된다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르며, 원핵생물인 경우, 이러한 조절 서열에는 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열이 있고; 진핵생물인 경우, 이러한 조절 서열에는 프로모터 및 전사 종결 서열이 있다. "조절 서열"이란 용어는 그 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 성분을 포함하는 것으로 간주하고, 리더 서열번호 및 융합 파트너 서열과 같이 그 존재가 유리한 추가 성분을 포함할 수도 있다.

[0106] "형질전환"은 외인성 DNA가 숙주 세포로 유입되는 임의의 공정을 의미한다. 형질전환은 당업계에서 공지된 다양한 방법을 사용하여 자연 또는 인공 조건 하에서 실시될 수 있다. 형질전환은 이중 핵산 서열을 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포로 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 따라 달라질 수 있다. 이러한 방법은 형질전환되는 숙주 세포에 따라 선택되는데, 그 예로는 바이러스 감염, 전기천공, 리포펙션 및 입자 충격이 있으나, 이에 국한되지는 않는다. 이러한 "형질감염된" 세포는 삽입된 DNA가 자율 복제성 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있는 안정적으로 형질감염된 세포를 포함한다. 또한, 이들 세포는 삽입된 DNA 또는 RNA를 한정된 시간 동안 일시적으로 발현하는 세포도 포함한다.

[0107] "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")란 용어는 외인성 DNA가 도입된 세포를 의미하는 것으로 간주한다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 예를 들어, 미국 특허 번호 제7,262,028호에 기재된 숙주 세포와 같이, 항체를 암호화하는 2개 이상(예를 들어, 다중) 핵산을 포함한다. 이러한 용어는 특정 피검체 세포뿐만

아니라 이 세포의 자손도 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 후속 세대에는 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 상기 자손은 사실상 모세포와 동일하지 않지만 본 명세서에 사용된 "숙주 세포"란 용어의 범위에는 포함되는 것으로 간주한다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 임의의 생물계에서 선택되는 원핵생물 및 진핵생물 세포를 포함하는 것이 바람직하다. 또 다른 양태에서, 진핵생물 세포에는 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포가 포함된다. 또 다른 양태에서, 숙주 세포는 원핵생물 세포주 이.콜라이; 포유동물 세포주 CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 및 PER.C6; 곤충 세포주 Sf9; 및 진균 세포 사카로마이세스 세레비치애를 포함하며, 이에 국한되지는 않는다.

[0108] 제조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 조직 배양과 형질전환(예, 전기천공, 리포펙션)에는 표준 기술을 사용할 수 있다. 효소 반응과 정제 기술은 제조업자의 지침에 따라 수행하거나 당업계에서 일반적으로 수행하는 바와 같이 또는 본 명세서에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. 상기 기술 및 절차들은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 또는 본 명세서에서 인용되고 논의된 각종 일반 문헌 및 특정 문헌들에 기술된 바와 같이 일반적으로 수행할 수 있다[본원에 참고인용된 문헌 Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)].

[0109] 당업계에 공지된 바와 같은 "유전자전이 유기체"란 전이유전자를 포함하는 세포를 가진 유기체를 의미하는 것으로서, 유기체(또는 이 유기체의 선조)에 도입된 전이유전자는 유기체에서 자연 발현되지 않는 폴리펩타이드를 발현한다. "전이유전자"는 유전자전이 유기체가 발생하는 세포의 게놈으로 안정적이고 작동적으로 통합되어, 유전자전이 유기체의 하나 이상의 세포 형태 또는 조직에서 암호화된 유전자 산물의 발현을 유도하는 DNA 작제물이다.

[0110] "조절하다" 및 "조정하다"란 용어는 당해 분자의 활성(예, 사이토킨의 생물학적 활성)에 있어서 변화 또는 변경을 의미한다. 조절은 당해 분자의 특정 활성 또는 기능의 정도(magnitude)에 있어서의 증가 또는 감소일 수 있다. 분자 활성 및 기능의 예에는 결합 특징, 효소 활성, 세포 수용체 활성화 및 시그널 전달 등이 있으나, 이에 국한되지는 않는다.

[0111] 이와 마찬가지로, "조절인자"란 용어는 당해 분자의 활성 또는 기능(예, 사이토킨의 생물학적 활성)을 변화 또는 변경시킬 수 있는 화합물이다. 예를 들어, 조절인자는 이 조절인자의 부재 시 관찰되는 활성 또는 기능의 정도에 비교했을 때 분자의 특정 활성 또는 기능의 정도에 있어서의 증가 또는 감소를 유발할 수 있다. 특정 양태에서, 조절인자는 분자의 하나 이상의 활성 또는 기능의 정도를 감소시키는 억제제이다. 억제제의 예에는 단백질, 펩타이드, 항체, 펩티마이드(peptibody), 탄수화물 또는 유기 소분자가 있으나, 이에 국한되지 않는다. 펩티마이드는 WO 01/83525 등에 기술되어 있다.

[0112] "효능제(agonist)"란 용어는 목적하는 분자와 접촉했을 때 효능제의 부재 시 관찰되는 활성 또는 기능의 정도와 비교했을 때 당해 분자의 특정 활성 또는 기능의 정도에 있어서의 증가를 유발하는 조절인자를 의미한다. 목적하는 특정 효능제에는 항원에 결합하는 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물 및 임의의 다른 분자가 포함될 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0113] "길항제" 또는 "억제제"란 용어는 목적하는 분자와 접촉했을 때, 길항제의 부재 시 관찰되는 활성이나 기능의 정도와 비교했을 때 당해 분자의 특정 활성이나 기능의 정도에 있어서의 감소를 유발하는 조절인자를 의미한다. 목적하는 특정 길항제에는 항원의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단 또는 조절하는 물질이 포함된다. 항원의 길항제 및 억제제에는 항원에 결합하는 단백질, 핵산, 탄수화물 및 임의의 다른 분자가 포함되나, 이에 국한되지는 않는다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 경감시키거나 완화시키거나 장애의 진행을 억제하거나 차단하거나, 장애를 퇴화시키거나, 재발, 발병, 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 개시 또는 진행을 억제하거나 차단하거나, 장애를 검출하거나 또 다른 치료의 예방학적 또는 치료학적 효과(들)(예를 들어, 예방학적 또는 치료학적 제제)를 증진시키거나 개선시키는데 충분한 치료량을 언급한다.

[0115] "환자" 및 "피검체"는 본원에서 영양류(예를 들어, 사람, 원숭이 및 침팬지), 비-영양류(예를 들어, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아 피그, 고양이, 개, 랫트, 마우스, 및 고래)를 포함하는 포유동물, 새(예를 들어, 오리 또는 거위) 및 상어와 같은 동물을 언급하기 위해 상호교환적으로 사용될 수 있다. 바람직하게, 환자 또는 피검체는 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료되거나 진단되는 사람, 질환, 장애 또는 병태 위험에 처한 사람, 질환, 장애 또는 병태를 갖는 사람 및/또는 질환, 장애 또는 병태를 위해 치료되는 사람과 같은 사람이다.

- [0116] 본 명세서에 사용된 "시료"란 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되고 있다. 본 명세서에 사용된 "생물학적 시료"는 생물체 또는 이전 생물체에서 유래하는 임의의 양의 물질을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 생물체에는 사람, 마우스, 래트, 원숭이, 개, 토끼 및 다른 동물이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 상기 물질에는 혈액(예를 들어, 전혈), 혈장, 혈청, 뇨, 양막액, 윤활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 기타 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장이 있으나, 이에 국한되지 않는다.
- [0117] "성분", "성분들" 및 "하나 이상의 성분"은 일반적으로, 본원에 기재된 방법 및 당업계에 공지된 기타 방법에 따라, 시험 시료(예를 들어, 환자 뇨, 혈청 또는 혈장 시료)의 분석을 위해 키트에 포함될 수 있는 포획 항체, 검출 또는 접합체 항체, 대조군, 계측기, 일련의 계측기, 민감성 패널, 컨테이너, 완충액, 희석제, 염, 효소, 효소에 대한 조인자, 검출 시약, 전처리 시약/용액, 기질(예를 들어, 용액으로서) 및 종료 용액 등을 언급한다. 따라서, 본원에서, "하나 이상의 성분", "성분" 및 "성분들"은 예를 들어, 항-분석물(예를 들어, 항-폴리펩타이드) 항체에 결합함에 의해 고정 지지체상에 임의로 고정화된 폴리펩타이드와 같은 분석물을 포함하는 조성물과 같은 상기된 바와 같은 폴리펩타이드 또는 다른 분석물을 포함할 수 있다. 몇몇 성분들은 용액중에 있을 수 있거나 분석용으로 재구성하기 위해 동결건조될 수 있다.
- [0118] "대조군"은 분석물을 함유하지 않는 것으로 공지된 조성물("음성 대조군") 또는 분석물을 함유한 것으로 공지된 조성물("양성 대조군")을 언급한다. 양성 대조군은 공지된 농도의 분석물을 포함할 수 있다. "대조군", "양성 대조군" 및 "계측기"는 공지된 농도의 분석물을 포함하는 조성물을 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. "양성 대조군"은 분석 수행능 특성을 설정하기 위해 사용될 수 있고 시약(예를 들어, 분석물)의 위상에 대해 유용한 지시기이다.
- [0119] "예비결정된 컷오프" 및 "예비결정된 수준"은 일반적으로 예비결정된 컷오프/수준(여기서, 예비결정된 컷오프/수준은 이미 다양한 임상 파라미터(예를 들어, 질환의 중증도, 진행성/비진행성/개선 등)와 연계되어 있거나 연관되어 있다)에 대해서 분석 결과를 비교함에 의해 진단/예후/치료학적 효능을 평가하기 위해 사용되는 분석 컷오프값을 언급한다. 본 발명은 예시적인 예비 결정된 수준을 제공할 수 있고, 컷오프 값이 면역분석(예를 들어, 사용된 항체 등)의 성질에 따라 다양할 수 있음은 널리 공지되어 있다. 추가로 본원에 기재된 바를 토대로 당해 다른 분석을 위한 면역분석-특이적 컷오프 값을 수득하기 위해, 다른 면역분석에 대해서 본원에 기재된 내용을 채택한다는 것은 당업자의 기술 범위내에 있다. 예비결정된 컷오프/수준의 정확한 값은 분석간에 다양할 수 있는 반면, 본원에 기재된 바와 같은 관련성(존재하는 경우)이 일반적으로 적용가능해야만 한다.
- [0120] 본원에 기재된 바와 같은 진단 분석에 사용된 바와 같은 "전처리 시약" 예를 들어, 용해, 침전 및/또는 가용화 시약은 임의의 용해시키는 시약 및/또는 시험 시료에 존재하는 임의의 분석물을 가용화시키는 시약이다. 전처리는 본원에서 추가로 기재한 바와 같이 모든 시료에 대해 필수적인 것은 아니다. 무엇보다, 분석물(예를 들어, 목적하는 폴리펩타이드)을 가용화시켜 시료내 존재하는 임의의 내인성 결합 단백질로부터 분석물을 방출시키는 것이 필수적이다. 전처리 시약은 동중성(분리 단계를 요구하지 않음) 또는 이중성(분리 단계를 요구함)일 수 있다. 이중성 전처리 시약을 사용하여, 다음 단계의 분석으로 진행하기 전에 시험 시료로부터 침전된 분석물 결합 단백질을 제거한다.
- [0121] 상기된 면역분석 및 키트에 대한 내용중에 "품질 대조군 시약"은 계측기, 대조군 및 민감성 패널을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "계측기" 또는 "표준물"은 전형적으로 항체 또는 분석물과 같은 분석물의 농도 외삽용 계측(표준) 곡선을 작성하기 위해 사용된다(예를 들어, 하나 이상, 예를 들어, 다수). 또한, 예비결정된 양성/음성 컷오프 근처에 있는 단일 계측기가 사용될 수 있다. 다중 계측기(즉, 하나 이상의 계측기 또는 다양한 양의 계측기(들))가 "민감성 패널"을 포함하도록 연계하여 사용될 수 있다.
- [0122] "위험"은 현재 또는 향후 몇몇 시점에서 발생하는 특정 사건의 가능성 또는 가망성을 언급한다. "위험도 층별화(Risk stratification)"는 담당의가 환자를 저, 중, 고 또는 최고 위험의 특정 질환, 장애 또는 병태의 발병으로 분류할 수 있게 해주는 일련의 공지된 임상적 위험 인자를 언급한다.
- [0123] 특이적 결합쌍(예를 들어, 항원(또는 이의 단편) 및 항체(또는 이의 항원적으로 반응성인 단편))의 구성원간의 상호작용에서 "특이적" 및 "특이성"은 상호작용의 선택적 반응성을 언급한다. 용어 "특이적으로 결합하는" 및 이의 유사 용어는 항체(또는 이의 항원적 반응성 단편)이 분석물(또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하지만 다른 실체에는 특이적으로 결합하지 않는 능력을 언급한다.
- [0124] "특이적 결합 파트너"는 특이적 결합쌍의 구성원이다. 특이적 결합쌍은 화학적 또는 물리적 수단을 통해 서로 특이적으로 결합하는 2개의 상이한 분자를 포함한다. 따라서, 통상의 면역분석의 항원 및 항체 특이적 결합쌍에

추가로, 다른 특이적 결합쌍은 비오틴 및 아비딘(또는 스트렙타비딘), 탄수화물 및 렉틴, 상보적 뉴클레오타이드 서열, 효능인자 및 수용체 분자, 조인자 및 효소, 효소 억제제 및 효소 등을 포함할 수 있다. 추가로, 특이적 결합 쌍은 본래의 특이적 결합 구성원의 유사체, 예를 들어, 분석물-유사체인 구성원을 포함할 수 있다. 면역반응성 특이적 결합 구성원은 분리되거나 재조합적으로 제조되거나 상관없이 항원, 항원 단편 및 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 포함하는 항체 및 이의 복합체, 단편 및 변이체(변이체의 단편을 포함)를 포함한다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같은 "변이체"는 아미노산의 부가(예를 들어, 삽입), 결실 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열에 있어서 소정의 폴리펩타이드(예를 들어, IL-18, BNP, NGAL 또는 HIV 폴리펩타이드 또는 항-폴리펩타이드 항체)와는 상이하지만 소정의 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 보유하는(예를 들어, 변이체 IL-18은 IL-18에 결합하는 것에 대해 항-IL-18 항체와 경쟁할 수 있다) 폴리펩타이드를 의미한다. 아미노산의 보존성 치환, 즉, 유사한 성질(예를 들어, 소수성 및 하전 정도 및 하전 영역의 분포)을 갖는 상이한 아미노산으로의 대체는 전형적으로 최소의 변화를 포함하는 것으로서 인지된다. 이들 최소의 변화는 부분적으로 당업계(문헌참조: Kyte et al. (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132)에서 이해되는 바와 같이 아미노산의 하이드로패틱 지수(hydrophobic index)를 고려하여 동정될 수 있다. 아미노산의 하이드로패틱 지수는 소수성 및 하전의 고려를 기준으로 한다. 유사한 하이드로패틱 지수의 아미노산이 치환되어 여전히 단백질 기능을 보유할 수 있다는 것은 당업계에 공지되어 있다. 하나의 측면에서,  $\pm 2$ 의 하이드로패틱 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 또한 아민산의 친수성은 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 유도하는 치환을 밝히기 위해 사용될 수 있다. 펩타이드와 관련하여 아미노산의 친수성을 고려하여 펩타이드의 최대 국소 평균 친수성을 계산할 수 있고 이는 항원성 및 면역원성과 연관된 것으로 보고된 유용한 측정치이다(문헌참조: 미국 특허 제4,554,101호). 유사한 친수성값을 갖는 아미노산의 치환은 생물학적 활성, 예를 들어, 당업계에서 이해되는 바와 같은 면역원성을 보유하는 펩타이드를 유도할 수 있다. 하나의 측면에서, 치환은 서로  $\pm 2$  이내의 친수성값을 갖는 아미노산으로 수행된다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값 둘다 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향받는다. 당해 관찰과 일관되게 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 하전, 크기 및 다른 성질에 의해 나타나는 바와 같이 아미노산 및 특히 아미노산의 측쇄의 상대적 유사성에 의존하는 것으로 이해된다. "변이체"는 또한 단백질 용해, 인산화, 또는 기타 해독후 변형과 같은 차등적으로 가공되었으나 이의 생물학적 활성 또는 항원 반응성, 예를 들어, IL-18에 결합하는 능력을 보유하는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 기재하는 사용될 수 있다. 본원에서 "변이체"의 사용은 본원에서 달리 언급되지 않는 경우 변이체의 단편을 포괄하는 것으로 의도된다.

## [0126] I. DVD 결합 단백질의 제조

[0127] 본 발명은 하나 이상의 표적에 결합하는 이원 가변 도메인 결합 단백질 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 결합 단백질은 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>[여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, C는 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 폴리펩타이드이고, X2는 Fc 영역이고 n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드 체를 포함한다. 본 발명의 결합 단백질은 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명은 발현 벡터, 숙주 세포 및 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

## [0128] A. 모 모노클로날 항체의 제조

[0129] DVD 결합 단백질의 가변 도메인은 목적하는 항원에 결합하는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 포함하는, 모 항체로부터 수득될 수 있다. 이들 항체는 천연에 존재할 수 있거나 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0130] MAb는 하이브리도마, 재조합 및 파아지 디스플레이 기술 또는 이의 조합을 포함하는 당업계에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, mAb는 당업계에 공지된 기술을 포함하여 예를 들어, 문헌[Harlow et al. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.); Hammerling, et al. (1981) in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y.)]에 교시된 하이브리도마 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에 제한되지 않는다. 용어 "모노클로날 항체"는 임의의 진행, 원핵 또는 파아지 클론을 포함하여 단일 클론으로부터 유래되지만 이를 생성시키는 방법에 의해 유래되지 않는 항체를 언급한다. 하이브리도마는 하기 실시예 1에서 논의되는 바와 같이 선별하고 클로닝하고 추가로 강한 하이브리도마 성장, 고 항체 생산 및 목적하는 항체 특성을 포함하여 목적하는 특성에 대해 스크리닝한다. 하이브리도마는 동일유전자계 동물, 면역계가 결핍된 동물, 예를 들어, 누드 마우스와 같은 생체내에서 또는 시험관내 세포 배양에서 배양하고 증식시킬 수 있다. 하이브리도마를 선별하고 클로닝하고 증식시키는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 특정 양태에서, 하이브리도마는 상기 논의된 바와 같이 마우스 하이브리도마이다. 또 다른 바

람직한 양태에서, 하이브리도마는 랫트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말과 같은 비사람, 비마우스 종에서 제조된다. 또 다른 양태에서, 하이브리도마는 사람 하이브리도마이고 이때 사람 비-분비 골수종이 특이 항원에 결합하는 항체를 발현하는 사람 세포와 융합된다.

[0131] 제조함 mAb는 문헌[U.S. Patent No. 5,627,052, PCT Publication WO 92/02551; 및 Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848]에 기재된 바와 같이 선택된 림프구 항체 방법(SLAM)과 같이 당업계에서 언급된 과정을 사용하여 단일의 분리된 림프구로부터 생성된다. 본 방법에서, 목적하는 항체를 분비하는 단일 세포, 예를 들어, 면역화된 동물로부터 유래된 림프구는 동정되고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 cDNA를 역전사효소 PCR에 의해 세포로부터 수득한다. 이들 가변 영역을 적절한 면역글로불린 불변 영역(예를 들어, 사람 불변 영역)과 관련하여 COS 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 생체내 선별된 림프구로부터 유래된 증폭된 면역글로불린 서열로 형질감염된 숙주 세포를 이어서 추가 분석하고 예를 들어, 형질감염된 세포를 선별하여 목적하는 항원에 대한 항체를 발현하는 세포를 분리함에 의해 선별할 수 있다. 증폭된 면역글로불린 서열은 추가로 예를 들어, 문헌[PCT Publication WO 97/29131 및 PCT Publication WO 00/56772]에 기재된 바와 같은 시험관내 친화성 성숙화 방법에 의해 추가로 조작할 수 있다.

[0132] 모노클로날 항체는 또한 사람 면역글로불린 좌의 일부 또는 전부를 포함하는 비-사람 동물을 목적하는 항원으로 면역화시켜 제조된다. 하나의 양태에서, 비-사람 동물은 사람 면역글로불린 좌의 대형 단편을 포함하고 마우스 항체 생산이 결핍된 유전자 조작된 마우스 균주인 XENOMOUSE 유전자 전이 마우스이다. 문헌[Green *et al.* (1994) *Nature Genet.* 7: 13-21 및 미국 특허 5,916,771; 5,939,598; 5,985,615; 5,998,209; 6,075,181; 6,091,001; 6,114,598; 및 6,130,364]을 참조한다. 또한, PCT 공개 번호 WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; 및 WO 00/037504도 참조한다. XENOMOUSE 유전자 전이 마우스는 완전하게 사람 항체의 성인계 사람 목록을 생산하고, 항원 특이적인 사람 Mab를 생성한다. XENOMOUSE 유전자 전이 마우스는 사람 중쇄 좌 및 x 경쇄 좌의 메가염기 크기의 배선 형태 YAC 단편의 도입을 통해 사람 항체 목록의 약 80%를 포함한다[본원에 참고인용된 Mendez *et al.* (1997) *Nature Genet.* 15: 146-156; Green and Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188: 483-495 참조].

[0133] 또한, 본 발명의 항체 제조에는 시험관내 방법도 사용할 수 있는데, 여기서 항체 라이브러리를 스크리닝하여 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체를 동정한다. 제조함 항체 라이브러리를 선별하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예컨대 문헌[Ladner *et al.*, 미국 특허 5,223,409; PCT 공개 번호 WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; 및 WO 97/29131; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucl. Acid Res.* 19: 4133-4137; 및 Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982, 및 미국 특허 공개 2003/0186374] 등에 설명된 방법을 포함한다.

[0134] 본 발명의 모 항체는 또한 당업계에 공지된 다양한 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 파아지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 파아지 입자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 파아지 입자 표면에 나타난다. 특히, 당해 파아지는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 사람 또는 쥐)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 나타내는데 사용될 수 있다. 목적하는 항원과 결합하는 항원 결합 도메인 발현 파아지는 예를 들어, 표지된 항원 또는 고정 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선별되거나 동정될 수 있다. 이들 방법에 사용되는 파아지는 전형적으로 파아지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 제조함적으로 융합된 Fab, Fv 또는 디설파이드 안정화된 Fv 항체 도메인을 갖는 파아지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 필라멘트형 파아지이다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파아지 디스플레이 방법의 예는 문헌[Brinkman *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic *et al.* (1997) *Gene* 187:9-18; Burton *et al.* (1994) *Advances in Immunol.* 57:191-280; PCT 출원 번호 PCT/GB91/01134; PCT 공보 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; 및 WO 95/20401; 및 U.S. 특허 제5,698,426호; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108]에 기재된 것들을 포함한다.

[0135] 상기 문헌에 기재된 바와 같이, 파아지 선별 후, 파아지로부터 항체 암호화 영역을, 하기에 상세히 기재되는 바

와 같이 분리할 수 있고 이를 사용하여 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 포함하는 임의의 목적하는 숙주에서 발현되는 사람 항체 또는 임의의 다른 목적하는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생산할 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 제조함으로써 생산하기 위한 기술은 또한 문헌[PCT 공보 WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al. (1995) AJRI 34:26-34; 및 Better et al. (1988) Science 240:1041-1043]에 기재된 것들과 같은 방법을 당업계에 공지된 방법을 사용하여 사용될 수 있다. 단일체 Fv 및 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 기술의 예는 문헌[U.S. 특허 4,946,778 및 5,258,498; Huston et al. (1991) Methods Enzymol. 203:46-88; Shu et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7995-7999; 및 Skerra et al. (1988) Science 240:1038-1040]에 기재된 것들을 포함한다.

[0136] 파아지 디스플레이에 의한 재조합 항체 라이브러리의 스크리닝에 대한 대안으로, 대형 조합 라이브러리에 대해 당업계에 공지된 기타 방법을 적용하여 본 발명의 이원 특이성 항체를 동정할 수 있다. 한가지 유형의 또 다른 발현 시스템은 문헌[PCT Publication No. WO 98/31700 및 Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302]에 기재된 바와 같이 재조합 항체 라이브러리가 RNA 단백질 융합으로서 발현되는 것이다. 당해 시스템에서, 공유 융합은 mRNA 및 3' 말단에 푸로마이신, 펩티딜 수용체 항생제를 함유하는 합성 mRNA의 시험관내 해독에 의해, 암호화된 펩타이드 또는 단백질 사이에서 형성된다. 따라서, 특이적 mRNA는 암호화된 펩타이드 또는 단백질, 예를 들어, 항체 또는 이의 일부(예를 들어, 항체 결합부 또는 이의 일부)의 이원 특이성 항원에 대한 성질을 기준으로 mRNA의 배합 혼합물(예를 들어, 조합 라이브러리)로부터 집적될 수 있다. 당해 라이브러리의 스크리닝으로부터 회수된 항체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열은 상기된 바와 같이(예를 들어, 포유동물 숙주 세포에서) 재조합 수단에 의해 발현될 수 있고 특히, 본래에 선별된 서열에 돌연변이가 도입된 mRNA-펩타이드 융합을 추가로 스크리닝함에 의해 또는 상기된 바와 같은 재조합 항체의 친화성 성숙화를 위한 기타 방법에 의해 친화성이 추가로 성숙화될 수 있다.

[0137] 또 다른 방법에서, 본 발명의 항체는 또한 당업계에 공지된 효모 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 효모 디스플레이 방법에서, 유전학적 방법을 사용하여 항체 도메인을 효모 세포벽에 부착시키고 이들을 효모의 표면에 나타나게 할 수 있다. 특히, 당해 효모를 사용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들어, 사람 또는 쥐)로부터 발현되는 항원 결합 도메인이 나타나게 할 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 효모 디스플레이 방법의 예는 문헌[미국 특허 제6,699,658호]에 기재된 것들을 포함한다.

[0138] 상기된 항체는 추가로 변형시켜 CDR 접목 및 사람화된 모 항체를 생성시킬 수 있다. CDR-접목된 모 항체는 사람 항체 기원의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하고 이때, V<sub>H</sub> 및/또는 V<sub>L</sub>의 하나 이상의 CDR 영역은 목적하는 항원에 결합하는 쥐 항체의 CDR 서열로 대체된다. 임의의 사람 항체 기원의 골격 서열은 CDR 접목을 위한 주형으로서 작용할 수 있다. 그러나, 당해 골격상으로의 직쇄 대체는 흔히 항원에 대한 결합 친화성을 약간 손상시킨다. 사람 항체가 본래의 쥐 항체와 보다 동일할수록 쥐 CDR과 사람 골격의 조합이 CDR내에서 뒤틀림을 유발하여 친화성을 감소시킬 가능성이 보다 적어진다. 따라서, CDR을 제외한 쥐 가변 골격을 대체하도록 선택된 사람 가변 골격은 쥐 항체 가변 영역 골격과 65% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 바람직할 수 있다. CDR을 제외한 사람 및 쥐 가변 영역은 70% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 보다 바람직할 수 있다. 하나의 양태에서, CDR을 제외한 사람 및 쥐 가변 영역은 쥐 항체 가변 영역 골격과 75% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 보다 더 바람직할 수 있다. 특정 양태에서, CDR을 제외한 사람 및 쥐 가변 영역은 쥐 항체 가변 영역 골격과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 것이 가장 바람직할 수 있다. 또 다른 양태에서, 당해 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있고(문헌참조: EP 239,400; PCT 공보 WO 91/09967; 및 미국 특허 제5,225,539; 5,530,101; 및 5,585,089), 베니어링 또는 재표면화(문헌참조: EP 592,106; EP 519,596; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) *Prot. Engineer.* 7(6):805-814; 및 Roguska et al. (1994) *Proc. Acad. Sci. USA* 91:969-973, 및쇄 서폴링(미국 특허 제5,565,352호) 및 항-이디오타입 항체가 있다.

[0139] 사람화된 항체는 목적하는 항원에 결합하고, 비-사람 종 기원의 하나 이상의 CDR 및 사람 면역글로불린 분자 기원의 골격 영역을 갖는, 비-사람 종 기원의 항체 분자이다. 공지된 사람 Ig 서열은 예를 들어, 본원에 전반적인 내용이 참조로서 인용되는 하기 인터넷 주소 및 문헌에 기재되어 있다:

[0140] [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi); [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/); [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html); [www.public.iastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html); [www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm); [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html); [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html);

www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites\_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V\_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.; 및 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). 당해 입수된 서열을 사용하여 당업계에 공지된 바와 같이 면역원성을 감소시키거나 결합, 친화성, 결합율, 해리율, 결합도 (avidity), 특이성, 반감기 또는 임의의 기타 적합한 특징을 감소시키거나 증진시키거나 변형시킬 수 있다.

[0141] 사람 골격 영역내 골격 잔기는 상응하는 CDR 공여자 항체로 대체하여 항원 결합을 변화, 바람직하게는 개선시킬 수 있다. 이들 골격 대체는 예를 들어, CDR 및 골격 잔기의 상호작용에 대해 모델링하여 항원 결합과 서열 비교에 중요한 골격 잔기를 동정하여 특정 위치에서의 특정 골격 잔기를 동정함에 의해 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 동정된다(미국 특허 제5,585,089호; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323). 입체 면역글로불린 모델은 통상적으로 유용하고 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 설명하고 나타내는 컴퓨터 프로그램은 유용하다. 이들 디스플레이의 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 가능한 잔기의 역할에 대한 분석, 즉, 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기가 선별될 수 있고 컨센서스 및 입수 서열로부터 조합될 수 있어 표적 항원에 대한 증가된 친화성과 같은 목적하는 항체 특성이 달성된다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는데 관여한다. 항체는 문헌[Jones et al. (1986) Nature 321:522; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534; Sims et al. (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Prot. Engineer. 7(6):805-814; Roguska. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; PCT 공보 WO 91/09967; US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; 및 WO90/14430; 유럽 특허 공개 EP 229246; EP 592,106; EP 519,596; 및 EP 239,400; 및 미국 특허 5,565,332; 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 및 4,816,567]에 기재된 것들을 제한 없이 포함하는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 사립화될 수 있다.

## [0142] B. 모 모노클로날 항체를 선별하기 위한 기준

[0143] 본 발명의 한 양태는 DVD-Ig 분자내 하나 이상의 목적하는 성질을 갖는 모 항체를 선별하는 것이다. 하나의 양태에서, 목적하는 성질은 하나 이상의 항체 파라미터로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 항체 파라미터는 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인지, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동력학, 생물유용성, 조직 교차 반응성 및 유사 항원 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

## [0144] B1. 항원에 대한 친화성

[0145] 치료학적 mAb의 목적하는 친화성은 항원의 성질 및 목적하는 치료학적 엔드포인트에 따라 다양할 수 있다. 한 양태에서, 모노클로날 항체는 당해 상호작용이 통상적으로 고친화성 상호작용 (예를 들어, <pM - <nM 범위)임으로 사이토킨-사이토킨 수용체 상호작용을 차단하는 경우 보다 높은 친화성(Kd = 0.01 - 0.50 pM)을 갖는다. 이 경우에, 이의 표적에 대한 mAb 친화성은 이의 수용체에 대한 사이토킨(리간드)의 친화성 이상이어야만 한다. 한편, 보다 적은 친화성을 갖는 mAb (> nM 범위)는 예를 들어, 시퀀스터(sequester) 및 A-β 아밀로이드의 명백한 순환 종과 결합하는, 잠재적으로 순환하는 병원성 단백질, 예를 들어, 모노클로날 항체를 제거하는데 치료학적

으로 효과적일 수 있다. 다른 경우에, 부위 지시된 돌연변이 유발에 의해 기존의 고친화성 mAb의 친화성을 감소시키거나 표적에 대해 낮은 친화성을 갖는 mAb를 사용하여 잠재적인 부작용을 피할 수 있는데, 예를 들어, 고친화성 mAb는 이의 의도된 표적 모두를 격리/중화시켜 표적화된 단백질의 기능을 완전히 고갈/제거할 수 있다. 이러한 시나리오에서, 저친화성 mAb는 질환 증상(병리학적 또는 과생성 수준)에 관여할 수 있는 표적의 일부를 격리/중화시켜 표적의 일부가 계속해서 이의 정상적인 생리학적 기능을 수행할 수 있게 한다. 따라서, 용량을 조정하고/하거나 부작용을 감소시키기 위해 Kd를 감소시킬 수 있다. 모 mAb의 친화성은 목적하는 치료학적 결과를 달성하기 위해 세포 표면 분자를 적당히 표적화하는데 역할을 수행할 수도 있다. 예를 들어, 표적이 고밀도로 암 세포상에 및 저 밀도로 정상 세포상에 발현되는 경우, 저친화성 mAb는 정상 세포 보다는 종양 세포상의 다수의 표적물에 결합하여 ADCC 또는 CDC를 통해 종양 세포를 제거할 수 있고 따라서 치료학적으로 바람직할 수 있는 효과를 가질 수 있다. 따라서, 목적하는 친화성을 갖는 mAb의 선별은 가용성 및 표면 표적 둘다를 위해 적절할 수 있다.

[0146] 리간드와의 상호작용시 수용체를 통한 시그널 전달은 수용체 리간드 상호작용의 친화성에 의존할 수 있다. 유사하게, 표면 수용체에 대한 mAb의 친화성은 세포내 시그널 전달의 성질을 결정할 수 있고 mAb는 효능제 또는 길항제 시그널을 전달할 수 있는 것으로 생각할 수 있다. mAb 매개 시그널 전달의 친화성 기반 성질은 이의 부작용 프로파일에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 치료학적 모노클로날 항체의 목적하는 친화성 및 목적하는 기능은 시험관내 및 생체내 실험에 의해 결정될 필요가 있다.

[0147] 결합 단백질(예를 들어, 항체)의 목적하는 Kd는 목적하는 치료학적 결과에 따라 실험적으로 결정될 수 있다. 하나의 양태에서, 동일한 항원에 대한 DVD-Ig의 목적하는 친화성 이상의 특정 항원에 대한 친화성( $K_d$ )을 갖는 모 항체가 선택된다. 주어진 DVD-Ig 분자에 대한 모 항체는 동일한 항체이거나 또는 상이한 항체일 수 있다. 항원 결합 친화성 및 동력학은 바이어코어(Biacore) 또는 또 다른 유사 기술에 의해 평가된다. 하나의 양태에서, 각각의 모 항체는 최대 약  $10^{-7}$  M; 최대 약  $10^{-8}$  M; 최대 약  $10^{-9}$  M; 최대 약  $10^{-10}$  M; 최대 약  $10^{-11}$  M; 최대 약  $10^{-12}$  M; 및 최대 약  $10^{-13}$  M로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 대한 해리 상수( $K_d$ )를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 친화성( $K_D$ )을 가질 수 있다. 각각의 모 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 적어도 약  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 적어도 약  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 적어도 약  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 적어도 약  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; 및 적어도 약  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 대한 온 속도 상수( $K_{on}$ )를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 온 속도 상수( $K_{on}$ )를 가질 수 있다. 하나의 양태에서, 각각의 모 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 최대 약  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; 최대 약  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ; 최대 약  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; 및 최대 약  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 대한 오프 속도 상수( $K_{off}$ )를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 오프 속도 상수( $K_{off}$ )를 가질 수 있다.

## [0148] B2. 효능

[0149] 모 모노클로날 항체의 목적하는 친화성/효능은 목적하는 치료학적 결과에 의존할 것이다. 예를 들어, 수용체-리간드(R-L) 상호작용에 대해 친화성(kd)은 R-L kd (pM 범위) 이상이다. 예를 들어, 병리학적 순환 단백질의 단순한 제거를 위해, kd는 예를 들어, 다양한 종의 순환 A- $\beta$  펩타이드의 제거를 위해 낮은 nM 범위일 수 있다. 추가로, kd는 또한 표적이 예를 들어, A $\beta$  올리고머에서 mAb 표적화 특정 형태의 에피토프인 다중 카피의 동일한 에피토프를 발현하는지에 따라 다양할 것이다.

[0150] VD1 및 VD2가 동일한 항원에 결합하지만 구분되는 에피토프를 갖는 경우, DVD-Ig는 동일한 항원에 대해 4개의 결합 부위를 함유함에 따라서 결합가(avidity) 및 DVD-Ig의 겉보기 Kd를 증가시킨다. 하나의 양태에서, DVD-Ig에서 목적하는 것 이하의 Kd를 갖는 모 항체가 선택된다. 모 mAb의 친화성 고려는 또한 DVD-Ig가 4개 이상의 동일한 항원 결합 부위(즉, 단일 mAb로부터 DVD-Ig)를 함유하는지에 의존할 수 있다. 이 경우에, 겉보기 Kd는 결합가로 인해 mAb 보다 클 것이다. 이러한 DVD-Ig는 표면 수용체를 가교결합시키거나, 중화 효능을 증가시키거나 병리학적 단백질의 제거를 증진시키는 것 등을 위해 사용될 수 있다.

[0151] 하나의 양태에서 동일한 항원에 대해 DVD-Ig의 목적하는 중화 효능 이상의 특이적 항원에 대한 중화 효능을 갖는 모 항체가 선택된다. 중화 효능은 표적 의존적 생분석에 의해 측정될 수 있고, 이때 적당한 유형의 세포는 측정가능한 시그널(즉, 증식 또는 사이토킨 생산)을 표적 자극에 응답하여 생성하고 mAb에 의한 표적 중화는 용

량-의존적 방식으로 시그날을 감소시킬 수 있다.

[0152] **B3. 생물학적 기능**

[0153] 모노클로날 항체는 잠재적으로 여러 기능을 수행할 수 있다. 이들 기능중 몇몇은 표 1에 기재한다. 이들 기능은 시험관내 분석(예를 들어, 세포 기반 및 생화학적 분석) 및 생체내 동물 모델 둘다에 의해 평가될 수 있다.

**표 1**

**치료 항체들의 몇몇 잠재적 적용**

| 표적 (클래스)           | 작용 기전 (표적)                                                    |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| 가용성<br>(사이토킨, 기타)  | 활성의 중화 (예: 사이토킨)<br>제거율 향상 (예: Aβ 올리고머)<br>반감기 증가 (예: GLP 1)  |
| 세포 표면<br>(수용체, 기타) | 작용제 (예: GLP1 R; EPO R 등)<br>길항제 (예: 인테그린 등)<br>세포독성 (CD 20 등) |
| 단백질 침전물            | 제거/분해 향상 (예: Aβ 플라크, 아밀로이드 침전물)                               |

[0154]

[0155] 본원의 실시예에 기재된 구분되는 기능을 갖는 mAb(표 1)는 목적하는 치료학적 결과를 달성하기 위해 선택될 수 있다. 2개 이상의 선택된 모노클로날 항체를 이어서 DVD-Ig 포맷에 사용하여 단일 DVD-Ig 분자에 2개의 구분된 기능을 달성할 수 있다. 예를 들어, DVD-Ig는 특이적 사이토킨의 기능을 중화시키는 모 mAb를 선별하고, 병리학 적 단백질의 제거를 증진시키는 모 mAb를 선별함에 의해 제조될 수 있다. 유사하게 2개의 상이한 세포 표면 수용체를 인지하는 2개의 모 모노클로날 항체는 예를 들면, 하나의 수용체에 대해 효능제 기능을 갖는 하나의 mAb 및 다른 수용체에 대해 길항제 효능을 갖는 다른 mAb로 선택될 수 있다. 각각 구분된 기능을 갖는 이들 2개의 선택된 모노클로날 항체를 사용하여 단일 분자에서 선택된 모노클로날 항체의 2개의 구분된 기능(효능제 및 길항제)을 갖는 단일 DVD-Ig 분자를 작제할 수 있다. 유사하게, 각각의 수용체 리간드(예를 들어, EGF 및 IGF)의 결합을 각각 차단하는 세포 표면 수용체에 대한 2개의 길항작용 모노클로날 항체는 DVD-Ig 포맷에 사용될 수 있다. 역으로, 길항작용 항-수용체 mAb(예를 들어, 항-EGFR) 및 중화성 항-가용성 매개체(예를 들어, 항-IGF1/2) mAb는 DVD-Ig를 제조하기 위해 선별될 수 있다.

[0156] **B4. 에피토프 인지:**

[0157] 상이한 영역의 단백질은 상이한 기능을 수행할 수 있다. 예를 들어, 사이토킨의 특정 영역이 사이토킨 수용체와 상호작용하여 수용체 활성화를 유도할 수 있는 반면에 당해 단백질의 다른 영역은 사이토킨을 안정화시키기 위해 요구될 수 있다. 이 경우에 사이토킨 상에 수용체 상호작용 영역에 특이적으로 결합하여 사이토킨-수용체 상호작용을 차단하는 mAb를 선별할 수 있다. 몇몇 경우에, 예를 들어 다중 리간드에 결합하는 특정 케목친 수용체, 단지 하나의 리간드와 상호작용하는 에피토프(케목친 수용체 상의 영역)에 결합하는 mAb를 선별할 수 있다. 다른 경우에, 모노클로날 항체는 직접적으로 생리학적 기능의 단백질에 대해 관여하지 않는 표적상의 에피토프에 결합할 수 있지만 이들 영역으로의 mAb의 결합은 생리학적 기능을 방해하거나(입체 장애) 단백질이 기능하지 않도록(어느 리간드도 결합할 수 없도록 수용체 형태를 변화시킨 다중 리간드를 갖는 수용체에 대한 mAb) 단백질의 형태를 변화시킬 수 있다. 사이토킨의 이의 수용체로의 결합을 차단하지 않지만 시그날 전달을 차단하는 항-사이토킨 모노클로날 항체가 또한 동정되었다(예를 들어, 125-2H, 항-IL-18 mAb).

[0158] 에피토프 및 mAb 기능의 예는 수용체-리간드(R-L) 상호작용의 차단(R-상호작용 부위에 결합하는 중화성 mAb); 감소된 R-결합 또는 R-결합 부재를 유발하는 입체 장애를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. Ab는 수용체 결합 부위와는 다른 부위에서 표적에 결합할 수 있지만 형태적 변화를 유도하여 예를 들면 R에 결합하나 시그날 전달(125-2H)을 차단하는 기능을 제거함에 의해 수용체 결합 및 표적의 기능을 방해한다(예를 들어, Xolair).

[0159] 하나의 양태에서, 모 Ab는 최대 효능을 위해 적당한 에피토프를 표적화할 필요가 있다. 당해 에피토프는 DVD-Ig에서 보존되어야만 한다. mAb의 결합 에피토프는 공동-결정분석, mAb 항원 복합체의 제한된 단백질용해 + 질량 분광측정 펩타이드 맵핑(Legros V. et al. (2000) Protein Sci. 9:1002-10), 콤팩트 디스플레이된 펩타이드 라이브러리(O'Connor, K. H. et al. (2005) J. Immunol. Methods. 299:21-35), 및 돌연변이 유발(Wu C. et al.

(2003) J. Immunol. 170:5571-7)를 포함하는, 여러 방법에 의해 측정될 수 있다.

**[0160] B5. 생리화학적 및 약제학적 성질:**

**[0161]** 항체를 사용한 치료학적 치료는 흔히 수 mg/kg의 고용량의 투여를 필요로 한다(전형적으로 분자량이 높은 결과로서 질량을 기초로 낮은 효능 때문에). 환자 순응을 수용하고 만성 질환 치료법 및 외래환자 치료를 적당히 해결하기 위해, 치료학적 mAb를 피하(s.c.) 또는 근육내(i.m.) 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 피하 투여를 위한 최대 바람직한 용량은 약 1.0 mL이고 따라서 용량당 주사 횟수를 제한하기 위해 >100 mg/mL의 농도가 바람직할 수 있다. 하나의 양태에서, 치료학적 항체는 1회 용량으로 투여된다. 그러나 당해 제형의 개발은 단백질-단백질 상호작용(예를 들어, 면역원성 위험을 잠재적으로 증가시키는 응집) 및 프로세싱 및 전달동안에 한계(예를 들어, 점도)에 의해 제한된다. 결과적으로, 임상적 효능을 위해 요구되는 대용량 및 관련된 개발 한계점이 항체 제형의 잠재력 및 고용량 치료계획에서의 피하 투여를 완전하게 사용하는 것을 제한한다. 단백질 분자 및 단백질 용액의 생리화학적 및 약제학적 성질, 예를 들어, 안정성, 용해도 및 점도 특성이 가장 중요하다는 것은 명백하다.

**[0162] B5.1. 안정성:**

**[0163]** "안정한" 항체 제형은 본원의 항체가 필수적으로 이의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 저장시 생물학적 활성을 보유하는 제형이다. 안정성은 선택된 시간동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 하나의 양태에서, 제형중의 항체는 실온(약 30℃) 또는 40℃에서 1개월 이상동안 안정하고/하거나 약 2 내지 8℃에서 1년 이상, 예를 들면 2년 이상동안 안정하다. 추가로 하나의 양태에서, 당해 제형은 이후 "동결/해동 사이클"로서 언급되는 제형의 동결(예를 들어 -70℃까지) 및 해동 후 안정하다. 또 다른 예에서, "안정한" 제형은 약 10% 미만 및 약 5% 미만의 단백질이 제형내에 응집체로서 존재하는 제형일 수 있다.

**[0164]** 연장된 시간동안 다양한 온도에서 시험관내에서 안정한 DVD-Ig는 바람직할 수 있다. 이것은 승온, 예를 들어, 40℃에서 2 내지 4주동안 시험관내에서 안정한 모 mAb의 신속한 스크리닝에 의해 달성될 수 있고 이어서 안정성을 평가할 수 있다. 2 내지 8℃에서 저장동안에, 당해 단백질은 12개월 이상동안, 예를 들어 24개월 이상동안 안정함을 나타낸다. 안정성(단량체성 온전한 분자의 %)은 양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE, 및 생활성 시험과 같은 다양한 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 공유 및 형태적 변형을 분석하기 위해 사용될 수 있는 분석 기술의 보다 이해할 수 있는 목록은 문헌[참조: Jones, A. J. S. (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems. In: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides and proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22-45; and Pearlman, R.; Nguyen, T. FL(1990) Analysis of protein drugs. In: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301]을 참조한다.

**[0165]** 이중성 및 응집체 형성: 항체의 안정성은 제형이 약 10% 미만, 예를 들면 약 5% 미만, 예를 들면 약 2% 미만, 또는 응집체로서 존재하는 GMP 항체 물질중 0.5% 내지 1.5% 미만의 범위내일 수 있도록 한다. 크기 배제 크로마토그래피는 단백질 응집체의 검출에서 민감성이고 재생가능하고 매우 강력한 방법이다.

**[0166]** 낮은 응집체 수준 뿐만 아니라, 항체는 하나의 양태에서 화학적으로 안정해야만 한다. 화학적 안정성은 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 등전점 포커싱 또는 모세관 전기영동과 같은 다른 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 항체의 화학적 안정성은 2 내지 8℃에서 12개월 이상동안 저장 후 양이온 교환 크로마토그래피에서 비변형된 항체를 나타내는 피크를 저장 시험 전의 항체와 비교하여 20% 이하, 예를 들면 10% 이하 또는 5% 이하로 증가시킬 수 있다.

**[0167]** 하나의 양태에서, 모 항체는 구조적 위상을 나타낸다; 올바른 디설파이드 결합 형성 및 올바른 폴딩: 항체의 2 차 또는 3차 구조에서의 변화로 인한 화학적 불안정성은 항체 활성에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 항체의 활성에 의해 저적된 바와 같은 안정성은 2 내지 8℃에서 12개월 이상의 저장 후 항체의 활성을 저장 시험 전의 항체 용액과 비교하여 50% 이하, 예를 들면 30% 이하, 10% 이하, 또는 5% 또는 1% 이하로 감소시킬 수 있다. 적합한 항원 결합 분석을 사용하여 항체 활성을 측정할 수 있다.

**[0168] B5.2. 용해도:**

**[0169]** mAb의 "용해도"는 올바르게 폴딩된 단량체성 IgG의 생성과 관련이 있다. IgG의 용해도는 따라서 HPLC에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 가용성(단량체성) IgG는 HPLC 크로마토그램에 단일 피크를 생성시키는 반면 불용성(예를 들어, 다량체 및 응집된)은 다수의 피크를 생성시킨다. 당업자는 따라서 통상적인 HPLC 기술을 사용하여

IgG의 용해도를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 용해도를 분석하기 위해 사용될 수 있는 분석 기술의 보다 이해될 수 있는 목록을 위해 문헌(참조: Jones, A. G. (1993) *Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London*, London, UK. Editor(s): Shamlou, P. Ayazi. *Process. Solid-Liq. Suspensions*, 93-117. Publisher: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK and Pearlman et al. (1990) *Adv. in Parenteral, Sci. 4 (Pept. Protein Drug Delivery)*: 247-301)을 참조한다. 치료학적 mAb의 용해도는 흔히 적당한 용량을 위해 요구되는 고농도로 제형화시키는데 있어서 중요하다. 본원에 명시된 바와 같이, > 100 mg/mL의 용해도가 효율적인 항체 용량을 수용하기 위해 요구될 수 있다. 예를 들어, 항체 용해도는 초기 연구 단계에서 약 5mg/ml 이상일 수 있고, 진보 과정 과학 단계에서 약 25 mg/mL 이상, 또는 약 100 mg/mL 이상, 또는 약 150mg/ml 이상일 수 있다. 단백질 분자의 고유 성질, 예를 들어, 단백질 용액의 물리-화학적 성질, 예를 들어, 안정성, 용해도, 점도가 중요함은 당업자에게 자명하다. 그러나 당업자는 광범위한 부형제가 최종 단백질 제형의 특성에 이롭게 영향을 주는 첨가제로서 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 이들 부형제는 다음을 포함할 수 있다: (i) 액체 용매, 공용매(예를 들어, 알콜, 예를 들어, 에탄올); (ii) 완충제(예를 들어, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 및 아미노산 완충제); (iii) 당 또는 당 알콜 (예를 들어, 슈크로스, 트레할로스, 프럭토스, 라피노스, 만니톨, 소르비톨, 및 텍스트란); (iv) 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20, 40, 60, 80, 및 폴록사머); (v) 등장성 개질제 (예를 들어, 염, 예를 들어, NaCl, 당, 및 당 알콜); 및 (vi) 기타 (예를 들어, 방부제, 킬레이팅제, 항산화제, 킬레이팅 물질(예를 들어, EDTA), 생분해성 중합체, 및 담체 분자(예를 들어, HSA 및 PEG)).

[0170] 점도는 항체 제조 및 항체 프로세싱(예를 들어, 정용여과/한외여과), 충전-마무리 공정(펌핑 측면, 여과 측면) 및 전달 측면(주사능, 정교한 장치 전달)과 관련하여 매우 중요한 파라미터이다. 낮은 점도는 항체 용액이 보다 높은 농도가 되도록 할 수 있다. 이것은 동일 용량이 보다 적은 용적으로 투여될 수 있게 해준다. 적은 주사 용액은 주사시 통증을 보다 낮게 한다는 잇점을 갖게 하고 당해 용액은 환자내 주사시 통증을 감소시키기 위해 등장성일 필요는 없다. 항체 용액의 점도는 100(1/s)의 전달 비율에서 항체 용액 점도는 200mPa s 미만, 125mPa s 미만, 70mPa s 미만, 및 25mPa s 미만이거나, 또는 심지어 10mPa s 미만일 수 있다.

### [0171] B 5.3. 생성 효율

[0172] 차이나이즈 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포에서 효율적으로 발현되는 DVD-Ig의 생성은 하나의 양태에서, 이들 자체가 포유동물 세포에서 효율적으로 발현되는 2개의 모 모노클로날 항체를 요구한다. 안정한 세포주(즉, CHO)로부터 생성 효율은 약 0.5g/L 이상, 약 1 g/L 이상, 또는 약 2 내지 약 5 g/L 이상이어야만 한다(Kipriyanov, S. M. and Little, M. (1999) *Mol. Biotechnol.* 12:173-201; Carroll, S. and Al-Rubeai, M. (2004) *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:1821-9).

[0173] 포유동물 세포에서 항체 및 Ig 융합 단백질의 제조는 여러 인자에 의해 영향받는다. 강한 프로모터, 인핸서 및 선별 마커의 혼입을 통한 발현 벡터는 통합된 벡터 카피로부터 목적하는 유전자의 전사를 최대화시킬 수 있다. 고수준의 유전자 전사를 허용하는 벡터 통합 부위의 동정은 벡터 기원의 단백질 발현을 증강시킬 수 있다(Wurm et al. (2004) *Nature Biotechnol.* 22(11): 1393-1398). 추가로, 생성 수준은 항체 중쇄 및 경쇄의 비율 및 단백질 어셈블리 및 분비 공정에서 다양한 단계에 의해 영향받는다(Jiang et al. (2006) *Biotechnol. Prog.* 22(1): 313-8).

### [0174] B 6. 면역원성

[0175] 치료학적 mAb의 투여는 특정 빈도의 면역 반응(즉, 치료학적 mAb에 대한 내인성 항체의 형성)을 유도할 수 있다. 면역원성을 유도할 수 있는 잠재적인 요소는 모 모노클로날 항체의 분비동안에 분석되어야만 하고 당해 위험을 감소시키는 단계는 DVD-Ig 작제 전에 모 모노클로날 항체를 최대화하기 위해 수행될 수 있다. 마우스 유래된 항체는 환자에서 고도로 면역원성인 것으로 밝혀졌다. 마우스 가변 및 사람 불변 영역으로 이루어진 키메라 항체의 생성은 치료학적 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 필연적인 다음 단계를 제공한다(문헌참조: Morrison and Schlom, 1990). 또한, 치료학적 항체에 대해 문헌[Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-327]에 의해 기재된 바와 같이 면역원성은 쥐 CDR 서열을 사람 항체 골격(재형성/CDR 접목/사람화)으로 전달함에 의해 감소될 수 있다. 또 다른 방법은 설치류 가변 경쇄 및 중쇄 도메인으로 시작하는 "재표면화" 또는 "베니어링"으로 언급되고 단지 표면-접근 골격 아미노산이 사람의 것으로 변화되고 CDR 및 묻혀진 아미노산은 모 설치류 항체의 것으로 유지한다(문헌참조: Roguska et al. (1996) *Prot. Engineer* 9: 895-904). 또 다른 유형의 사람화에서, 전체 CDR을 접목시키는 것 대신, 하나의 기술이 항체의 이의 표적으로의 결합에 관여하는 CDR 잔기의 서브셋으로서 정의된 단지 "특이성-결정 영역"(SDR)을 접목시킨다(문헌참조: Kashmiri et al. (2005) *Methods* 36(1): 25-34). 이것은 가용한 항체-표적 복합체의 가용한 3차원 구조의 분석 또는 표적과의 상호작용

하는지를 결정하기 위한 항체 CDR 잔기의 돌연변이 분석을 통해 SDR의 동정을 가능하게 한다. 또한, 완전한 사람 항체는 쥐, 키메라 또는 사람화된 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 가질 수 있다.

[0176] 치료학적 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 또 다른 방법은 면역원성인 것으로 예측되는 특정 특이적 서열의 제거이다. 하나의 방법에서, 제1 세대 생물작용은 사람에서 시험되었고 수용가능하지 않게 면역원성인 것으로 밝혀진 후, B-세포 에피토프는 맵핑되고 면역 검출을 피하기 위해 변화될 수 있다. 또 다른 방법은 잠재적인 T 세포 에피토프를 예측하고 제거하는 방법을 사용한다. 컴퓨터 방법은 MHC 단백질과 결합하는 잠재력을 갖는 생물학적 치료제의 펩타이드 서열을 스캐닝하고 동정하기 위해 개발되었다(Desmet et al. (2005) Proteins 58: 53-69). 또한 사람 수지상 세포계 방법을 사용하여 잠재적인 단백질 알레르겐에서 CD4+ T-세포 에피토프를 동정할 수 있다(문헌참조: Stickler et al. (2000) J. Immunother. 23: 654-60; S. L. Morrison and J. Schlom (1990) Important Adv. Oncol. 3-18; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327; Roguska et al. (1996) Protein Engineer. 9: 895-904; Kashmiri et al. (2005) Methods 36(1): 25-34; Desmet et al. (2005) Proteins 58: 53-69; 및 Stickler et al. (2000) J. Immunotherapy 23: 654-60).

## [0177] B 7. 생체내 효능

[0178] 목적하는 생체내 효능을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 배합으로 주어지는 경우 유사하게 목적하는 생체내 효능을 갖는 mAb를 생성하고 선별하는 것이 중요하다. 그러나, 몇몇 경우에 DVD-Ig는 2개의 별도의 mAb를 배합하여 달성될 수 없는 생체내 효능을 나타낼 수 있다. 예를 들어, DVD-Ig는 2개의 표적을 근접하게 하여 2개의 별도의 mAb의 배합으로 달성될 수 없는 활성을 유도할 수 있다. 추가의 바람직할 수 있는 생물학적 기능은 섹션 B3에 본원에 기재되어 있다. DVD-Ig 분자에 바람직할 수 있는 특성을 갖는 모 항체는 약제동력학 t 1/2; 조직 분포; 가용성 대 세포 표면 표적 및 표적 농도-가용성/밀도-표면과 같은 인자를 기초로 선택될 수 있다.

## [0179] B 8. 생체내 조직 분포

[0180] 목적하는 생체내 조직 분포를 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 양태에서, 유사한 목적하는 생체내 조직 분포 프로필을 갖는 모 mAb가 선택되어야만 한다. 이를 고려하여, 모 mAb는 동일한 항체이거나 또는 상이한 항체일 수 있다. 또한, 이원 특이적 표적화 전략의 기작을 기준으로, 다른 시점에서 배합으로 주어지는 경우 유사하게 목적하는 생체내 조직 분포를 갖는 모 mAb를 선별하는 것이 요구되지 않을 수 있다. (예를 들어, 하나의 결합 성분이 DVD-Ig를 특이적 부위로 표적화하여 제2 결합 성분이 동일한 표적 부위에 오도록 유도하는 DVD-Ig의 경우이다). 예를 들어, DVD-Ig의 하나의 결합 특이성은 체장(섬 세포)을 표적화할 수 있고 다른 특이성은 GLP1을 체장으로 오게하여 인슐린을 유도할 수 있다.

## [0181] B 9. 이소타입:

[0182] 이소타입, 이펙터 기능 및 순환 반감기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 목적하는 성질을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 양태에서, 치료학적 용도 및 목적하는 치료학적 엔드포인트에 따라 적당한 Fc 이펙터 기능을 갖는 모 mAb를 선택한다. 모 mAb는 동일한 항체이거나 또는 상이한 항체일 수 있다. 5개의 주요 중쇄 부류 또는 이소타입이 있고 이중 몇몇은 여러 서브타입을 갖고 이들은 항체 분자의 이펙터 기능을 결정한다. 이들 이펙터 기능은 항체 분자의 힌지 영역, CH2 및 CH3 도메인에 있다. 그러나, 항체 분자의 다른 부분에서의 잔기는 또한 이펙터 기능에 효과를 가질 수 있다. 힌지 영역 Fc-이펙터 기능은 다음을 포함한다: (i) 항체 의존성 세포독성, (ii) 보체(C1q) 결합, 활성화 및 보체 의존성 세포독성 (CDC), (iii) 항원-항체 복합체의 식세포작용/제거, 및 (iv) 몇몇 경우에 사이토킨 방출. 항체 분자의 이들 Fc-이펙터 기능은 Fc-영역과 한 세트의 부류 특이적 세포 표면 수용체의 상호작용을 통해 매개된다. IgG1 이소타입의 항체는 대부분 활성이지만 최소 또는 IgG2 및 IgG4는 최소로 또는 어떠한 이펙터 기능을 갖지 않는다. IgG 항체의 이펙터 기능은 3개의 구조적으로 유사한 세포 Fc 수용체 유형(및 서브타입)(FcγR1, FcγR2 및 FcγR3)의 상호작용을 통해 매개된다. IgG1의 이들 이펙터 기능은 FcγR 및 C1q 결합을 위해 요구되는 하부 힌지 영역(예를 들어, L234A, L235A)에서 특이적 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 제거될 수 있다. Fc 영역에서 아미노산 잔기, 특히, CH2-CH3 도메인은 또한 항체 분자의 순화 반감기를 결정한다. 이러한 Fc 기능은 산성 리소좀으로부터 항체 분자의 일반적 순환으로 복귀시키는 재순환에 관여하는 신생 Fc 수용체(FcRn)으로의 Fc-영역의 결합을 통해 매개된다.

[0183] mAb가 활성 또는 불활성 이소타입을 가져야만 하는지의 여부는 항체에 대해 목적하는 치료학적 엔드포인트에 의존한다. 이소타입의 용도 및 목적하는 치료학적 결과에 대한 몇몇 예는 하기에 열거한다:

[0184] a) 목적하는 엔드포인트가 가용성 사이토킨의 기능성 중화작용인 경우, 불활성 이소타입이 사용될 수 있고;

- [0185] b) 목적하는 결과가 병리학적 단백질의 제거인 경우 활성 이소타입이 사용될 수 있고;
- [0186] c) 목적하는 결과가 단백질 응집체의 제거인 경우 활성 이소타입이 사용될 수 있고;
- [0187] d) 목적하는 결과가 표면 수용체를 길항시키는 것인 경우, 불활성 이소타입이 사용되고(Tysabri, IgG4; OKT3, 돌연변이된 IgG1);
- [0188] e) 목적하는 결과가 표적 세포를 제거하는 것인 경우, 활성 이소타입이 사용되고(Herceptin, IgG1 (및 증진된 이펙터 기능과 함께));
- [0189] f) 목적하는 결과가 CNS에 진입하는 것 없이 순환으로부터 단백질을 제거하는 것인 경우 IgM 이소타입이 사용될 수 있다(예를 들어, 순환하는 Ab 펩타이드 종의 제거).
- [0190] 모 mAb의 Fc 이펙터 기능은 당업계에 널리 공지된 다양한 시험관내 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0191] 논의된 바와 같이, 이소타입의 선별 및 이에 의한 이펙터 기능은 목적하는 치료학적 엔드포인트에 의존한다. 순환 표적의 단순한 중화가 요구되는 경우, 예를 들어, 수용체-리간드 상호작용을 차단시키는 경우, 이펙터 기능은 요구되지 않을 수 있다. 당해 경우에 이펙터 기능을 제거하는 항체의 Fc-영역내 이소타입 또는 돌연변이가 바람직할 수 있다. 표적 세포의 제거가 치료학적 엔드포인트인 다른 경우에, 예를 들어, 종양 세포를 제거하는 경우, 이펙터 기능을 증진시키는 Fc 영역에서 이소타입 또는 돌연변이 또는 탈푸코실화가 바람직할 수 있다(문헌참조: Presta G. L. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58:640-656 및 Satoh, M. et al. (2006) Expert Opin. Biol. Ther. 6:1161-1173). 유사하게, 치료학적 용도에 의존하여 항체 분자의 순환 반감기는 Fc 영역에서 특이적 돌연변이를 도입함에 의해 항체-FcRn 상호작용을 조절함에 의해 감소되거나/지연될 수 있다(문헌참조: Dall'Acqua, W. F. et al. (2006) J. Biol. Chem. 281 :23514-23524; Petkova, S.B. et al. (2006) Internat. Immunol. 18:1759-1769; Vaccaro, C. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:18709-18714).
- [0192] 정상의 치료학적 mAb의 상이한 이펙터 기능에 영향을 주는 다양한 잔기에 대한 공개된 정보는 DVD-Ig에 대해 확인될 필요가 있을 수 있다. DVD-Ig 포맷에서 모노클로날 항체 이펙터의 조절을 위해 동정된 것들 이외에 추가의 (상이한) Fc-영역 잔기가 중요할 수 있다.
- [0193] 전반적으로, Fc-이펙터 기능(이소타입)이 최종 DVD-Ig 포맷에서 중요한지에 관한 결정은 질환 증상, 치료학적 표적, 및 목적하는 치료학적 엔드포인트 및 안정성 고려에 따라 다양할 것이다.
- [0194] o IgG1 - 알로타입: G1mz
- [0195] o IgG1 돌연변이 - A234, A235
- [0196] o IgG2 - 알로타입: G2m(n-)
- [0197] o 카파 - Km3
- [0198] o Lambda를 포함하지만 이에 제한되지 않은 적당한 중쇄 및 경쇄 불변 영역이 예시된다.
- [0199] **Fc 수용체 및 C1q 연구:** 세포 막상에 임의의 과발현된 표적과 복합체를 형성하는 항체에 의한 원치않는 항체 의존적 매개된 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC)의 가능성은 (예를 들어, L234A, L235A) 힌지 영역 돌연변이에 의해 제거될 수 있다. mAb의 IgG1 힌지 영역에 존재하는 이들 치환된 아미노산은 FcR 결합이 IgG1 힌지 영역상의 중첩 부위내에 존재하는 것으로 사료됨에 따라 mAb의 사람 Fc 수용체(FcRn이 아니라)의 결합을 감소시킬 것으로 예상된다. 이러한 mAb의 특징은 야생형 IgG를 포함하는 항체에 대해 개선된 안전성 프로필을 유도할 수 있다. 사람 Fc 수용체로의 mAb의 결합은 FcγRIIb (또는 기타 FcγRs)를 발현하는 세포주(예를 들어, THP-1, K562) 및 조작된 CHO 세포주를 사용하는 유세포 분석 실험에 의해 결정될 수 있다. IgG1 대조군 모노클로날 항체와 비교하는 mAb는 FcγRI 및 FcγRIIa로의 감소된 결합을 보여주는 반면 FcγRIIb로의 결합은 영향받지 않는다. 항원/IgG 면역 복합체에 의한 C1q의 결합 및 활성화는 결과적으로 발생하는 염증 및/또는 면역조절 반응과 함께 전형적인 보체 캐스케이드를 유발한다. IgG상의 C1q 결합 부위는 IgG 힌지 영역에 위치하는 것으로 밝혀졌다. 증가하는 농도의 mAb에 결합하는 C1q는 C1q ELISA에 의해 평가되었다. 당해 결과는 야생형 대조군 IgG1의 결합과 비교하는 경우 예상되는 바와 같이 mAb가 C1q에 결합할 수 없음을 입증한다. 전반적으로, L234A, L235A 힌지 영역 돌연변이는 mAb의 FcγRI, FcγRIIa 및 C1q로의 결합을 제거시키지만 mAb와 FcγRIIb의 상호작용에는 영향을 주지 않는다. 이러한 데이터들은 돌연변이 Fc를 갖는 생체내 mAb가 정상적으로 억제 FcγRIIb와 상호작용하지만 활성화 FcγRI 및 FcγRIIa 수용체 또는 C1q와는 상호작용하지 않을 가능성이 있음을 시사한다.

- [0200] **사람 FcRn 결합:** 신생아 수용체(FcRn)는 태반을 거치는 IgG의 수송에 관여하고 IgG 분자의 이화작용 반감기를 조절한다. 효능을 개선시키거나, 용량 또는 투여 횟수를 감소시키거나 표적물로의 국소화를 개선시키기 위해 항체의 최종 반감기를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 역으로 즉, 항체의 최종 반감기를 감소시켜 전신 노출을 감소시키거나 표적 대 비표적 결합 비율을 개선시키는 것이 유리할 수 있다. IgG와 이의 구제 수용체 FcRn간의 상호작용을 조작하는 것이 IgG의 최종 반감기를 증가시키거나 감소시키는 방법을 제공한다. 순환내 IgG를 포함하는 단백질은 혈관 내피세포와 같은 특정 세포에 의한 미세음세포작용을 통해 유체 상에 흡수된다. IgG는 약산성 조건 (pH 6.0-6.5)하에 엔도좀내 FcRn과 결합할 수 있고 세포 표면으로 재순환될 수 있으며, 이것은 거의 중성 조건(pH 7.0-7.4)하에 방출된다. FcRn80, 16, 17상의 Fc-영역 결합 부위의 맵핑은 중 His310 및 His435에 걸쳐 보존된 2개의 히스티딘 잔기가 당해 상호작용의 pH 의존성에 관여함을 보여주었다. 파아지-디스 플레이 기술을 사용하여, FcRn으로의 결합을 증가시키고 마우스 IgG의 반감기를 연장시키는 마우스 Fc-영역 돌연변이가 동정되었다(문헌참조: Victor, G. et al. (1997) Nature Biotechnol. 15(7): 637-640). pH 6.0에서 FcRn에 대한 사람 IgG의 결합 친화성을 증가시키지만 pH 7.4에서는 증가시키지 않는 Fc-영역 돌연변이가 또한 동정되었다(문헌참조: Dall'Acqua, William F., et al. J. Immunol. 169(9): 5171-80). 더욱이, 한 경우에, 결합에서 유사한 pH 의존성 증가(27배 이하)는 또한 레서스 FcRn에 대해 관찰되었고, 이것은 모 IgG와 비교하여 레서스 몽키에서 혈청 반감기를 2배 증가시켰다(문헌참조: Hinton, P. R. et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(8), 6213-6216). 이들 발견은 Fc 영역과 FcRn의 상호작용을 조작함에 의해 항체 치료제의 혈장 반감기를 연장시킬 수 있음을 지적한다. 역으로, FcRn과의 상호작용을 감소시키는 Fc-영역 돌연변이는 항체 반감기를 감소시킬 수 있다.
- [0201] **B.10 약동력학(PK):**
- [0202] 목적하는 약동력학 프로필을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 양태에서, 유사하게 목적하는 약동력학 프로필을 갖는 모 mAb가 선택된다. 하나의 고려는 모노클로날 항체에 대한 면역원성 반응(즉, HAHA, 사람 항-사람 항체 반응; HACA, 사람 항-키메라 항체 반응)은 추가로 이들 치료학적 제제의 약동력학을 복잡하게 한다는 것이다. 하나의 양태에서, 최소의 면역원성을 갖거나 어떠한 면역원성을 갖지 않는 모노클로날 항체는 수득한 DVD-Ig가 또한 최소의 면역원성을 갖거나 어떠한 면역원성을 갖지 않도록 DVD-Ig 분자를 작제하기 위해 사용된다. mAb의 PK를 결정하는 인자 몇몇은 mAb의 고유 성질(VH 아미노산 서열); 면역원성; FcRn 결합 및 Fc 기능을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0203] 선택된 모 모노클로날 항체의 PK 프로필은 설치류에서 PK 프로필이 시노물거스 몽키 및 사람에서 모노클로날 항체의 PK 프로필과 양호하게 관련됨(또는 근접하게)으로써 설치류에서 용이하게 결정될 수 있다. PK 프로필은 실시예 섹션 1.2.2.3.A에서 기재된 바와 같이 결정된다.
- [0204] 목적하는 PK 특성(및 본원에서 논의된 바와 같은 기타 목적하는 기능성 성질)을 갖는 모 모노클로날 항체가 선택된 후, DVD-Ig가 작제된다. DVD-Ig 분자가 2개의 모 모노클로날 항체 기원의 2개의 항원 결합 도메인을 함유함으로써 DVD-Ig의 PK 성질이 또한 평가된다. 따라서, DVD-Ig의 PK 성질을 결정하면서, 2개의 모 모노클로날 항체 기원의 항원 결합 도메인 둘다의 기능성을 기준으로 PK 프로필을 결정하는 PK 분석이 사용될 수 있다. DVD-Ig의 PK 프로필은 실시예 1.2.2.3.A에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다. DVD-Ig의 프로필에 영향을 줄 수 있는 추가의 인자는 항원-결합 도메인(CDR) 배향; 링커 크기; 및 Fc/FcRn 상호작용을 포함한다. 모 상체의 PK 특성 분석은 하기의 파라미터를 평가함에 의해 평가될 수 있다: 흡수, 분배, 대사 및 분비.
- [0205] **흡수:** 지금까지, 치료학적 모노클로날 항체의 투여는 비경구 경로(예를 들어, 정맥내[IV], 피하[SC], 또는 근육내[IM])를 통해서이다. 간질 공간으로부터 SC 또는 IM 투여 후 전신 순환으로의 mAb의 흡수는 주로 림프 경로를 통해서이다. 포화될 수 있는, 예비전신성 단백질 용해 분해는 혈관의 투여 후 다양한 절대적 생물유용성을 유도할 수 있다. 일반적으로, 모노클로날 항체의 용량 증가와 함께 절대적 생물유용성의 증가는 보다 높은 용량에서 포화된 단백질 용해 능력으로 인해 관찰될 수 있다. mAb에 대한 흡수 과정은 통상적으로 림프액이 서서히 혈관계로 누출됨에 따라서 매우 느리고 흡수의 지속시간은 수시간 내지 수일간에 걸쳐 일어날 수 있다. SC 투여 후 모노클로날 항체의 절대적 생물유용성은 50% 내지 100%이다. DVD-Ig 작제물에 의해 표적화된 혈뇌 장벽에서 수송-매개 구조의 경우에, 혈장에서 순환 시간은 혈뇌 장벽(BBB)에서 CNS 격막으로의 증진된 세포통과 수송으로 인해 감소될 수 있고, 여기서, DVD-Ig는 이의 제2 항원 인지 부위를 통해 상호작용할 수 있도록 방출된다.
- [0206] **분배:** IV 투여 후, 모노클로날 항체는 신속한 분배 상에 이어서 느린 제거 상으로 시작하여 통상적으로 2상 혈청(또는 혈장) 농도-시간 프로필에 따른다. 일반적으로, 이중지수적 약동력학 모델은 당해 종류의 약리동력학적 프로필을 최상으로 기재한다. mAb에 대한 중추 격막(Vc)내 분배 용적은 통상적으로 혈장 용적(2 내지 3 리터)과

동일하거나 약간 크다. 시간 프로필에 대한 혈청(혈장) 농도에서 구분되는 2상 패턴은 투여의 또 다른 비경구 경로(예를 들어, IM 또는 SC)와 함께 명백하지 않을 수 있는데 그 이유는 혈청(혈장) 농도-시간 곡선의 분배 상이 긴 흡수부에 의해 차폐되기 때문이다. 물리화학적 성질, 부위 특이적 및 표적 배향된 수용체 매개된 흡수, 조직의 결합 능력 및 mAb 용량을 포함하는 많은 인자는 mAb의 생분배에 영향을 줄 수 있다. 이들 요소중 일부는 mAb에 대한 생분배에 비선형성으로 기여할 수 있다.

[0207] **대사 및 분비:** 분자 크기로 인해, 온전한 모노클로날 항체는 신장을 통해 뇨로 분비되지 않는다. 이들은 주로 대사(예를 들어, 이화작용)에 의해 불활성화된다. IgG-기본 치료학적 모노클로날 항체에 대해 반감기는 전형적으로 수시간 내지 1 내지 2일에서 20일 이상의 범위이다. mAb의 제거는 FcRn 수용체에 대한 친화성, mAb의 면역원성, mAb의 당화정도, 단백질용해에 대한 mAb의 민감성 및 수용체 매개 제거를 포함하지만 이에 제한되지 않는 많은 인자에 의해 영향 받을 수 있다.

[0208] **B.11 사람 및 tox 중 상의 조직 교차-반응성 패턴:**

[0209] 동일한 염색 패턴은 잠재적인 사람 독성이 tox 중에서 평가될 수 있음을 시사한다. Tox 종은 관련되지 않은 독성이 연구되는 동물들이다.

[0210] 개별 항체는 2개의 기준을 충족하도록 선택된다. (1) 항체 표적의 공지된 발현을 위해 적당한 조직 염색; 및 (2) 동일한 기관으로부터 기원하는 사람과 tox 조직간의 유사한 염색 패턴.

[0211] 기준 1 : 면역화 및/또는 항체 선별은 전형적으로 재조합 또는 합성된 항원(단백질, 탄수화물 또는 기타 분자)을 사용한다. 관련되지 않은 항원에 대한 천연 대응물과 역스크린에 결합하는 것은 흔히 치료학적 항체를 위한 스크리닝 퍼널(funnel)이다. 그러나, 다수의 항원에 대한 스크리닝은 흔히 비현실적이다. 따라서, 모든 주요 기관 기원의 사람 조직을 갖는 조직 교차-반응성 연구는 임의의 관련되지 않은 항원으로서의 항체의 원치않는 결합을 배제하는 작용을 한다.

[0212] 기준 2: 사람과 tox 중 조직(시노물거스 몽키, 개, 능히 설치류 및 기타, 동일한 36개 또는 37개 조직이 사람 연구에서와 같이 시험된다)은 tox 종의 선별을 입증하는 것을 도와준다. 동결된 조직 절편상의 전형적인 조직 교차 반응성 연구에서 치료학적 항체는 공지된 항원으로서의 예상된 결합 및/또는 보다 적은 정도로 낮은 수준의 상호작용(비특이적 결합, 유사한 항원으로서의 낮은 수준의 결합, 낮은 수준의 전하에 기초한 상호작용 등)을 기초로 하는 조직으로서의 결합을 입증할 수 있다. 임의의 경우, 대부분의 관련 독성학 동물 종은 사람 및 동물 조직에 동시에 고도로 결합하는 종이다.

[0213] 조직 교차 반응성 연구는 다음 지침서[EC CPMP Guideline 111/5271/94 "Production and quality control of mAbs" and the 1997 U.S. FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use"]를 포함하는 적당한 조절 지침에 따른다. 부검 또는 생검에서 수득된 사람 조직의 동결절편(5  $\mu$ m)을 고정시키고 대물 유리상에서 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행하였다. FDA's 지침 "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use".

[0214] 조직 교차 반응성 연구는 흔히 2개의 단계로 수행되고 제1 단계는 사람 공여자 기원의 32개 조직(전형적으로: 부신, 위장관, 전립선, 방광, 심장, 골격근, 혈액 세포, 신장, 피부, 골수, 간, 척수, 유방, 폐, 비장, 소뇌, 림프절, 고환, 대뇌피질, 난소, 흉선, 결장, 췌장, 전립선, 갑상선, 내피, 부갑상선, 수뇨관, 눈, 뇌하수체, 자궁, 나팔관 및 태반)의 동결절편을 포함한다. 제2 단계에서, 완전한 교차 반응성 연구는 3명의 관련되지 않은 성인 기원의 38개 이하의 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경관, 식도, 눈, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침선, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도선, 수뇨관, 뇨 방광 및 자궁)을 사용하여 수행된다. 연구는 전형적으로 최소로 2개의 용량 수준에서 수행된다.

[0215] 치료학적 항체(즉, 시험 제품) 및 이소형 매치된 대조군 항체는 아비딘-비오틴 복합체(ABC) 검출을 위해 비오틴화될 수 있다. 기타 검출 방법은 FITC(또는 그 밖에) 표지된 시험 제품에 대한 3차 항체 검출 또는 비표지된 시험 제품에 대한 표지된 항-사람 IgG와의 예비 복합체 형성을 포함할 수 있다.

[0216] 간략하게, 부검 또는 생검에서 수득된 사람 조직의 동결절편(약 5  $\mu$ m)을 고정화하고 대물 글래스상에서 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다. 먼저(예비 복합체 형성 검출 시스템의 경우), 시험 제품은 2차 비오틴화된 항-사람 IgG로 항온처리하고 면역 복합체가 되도록 한다. 시험 제품 2 및 10  $\mu$ g/mL의 최종 농도에서 면역 복합체는 대물 글래스상의 조직 절편상으로 첨가하고 조직 절

편은 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 키트와 30분동안 반응시킨다. 이어서 DAB (3,3'-디아미노벤지딘), 퍼옥시다제 반응을 위한 기질을 조직 염색을 위해 4분동안 적용한다. 항원-세포로스 비드는 양성 대조군 조직 절편으로서 사용한다.

- [0217] 임의의 특이적 염색은 미지의 표적 항원의 공지된 발현을 토대로 예상되거나(예를 들어, 항원 발현과 일치하여) 예상치 않은 반응성인 것으로 판단된다. 특이적인 것으로 판단된 임의의 염색은 강도 및 분포에 대해 스코어된다. 항원 또는 혈청 경쟁 또는 차단 연구는 관찰된 염색이 특이적 또는 비특이적인지를 결정하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0218] 2개의 선택된 항체가 선택 기준(적당한 조직 염색, 및 사람과 독성 동물 특이적 조직 간의 염색 일치)을 충족하는 것으로 밝혀진 경우, 이들은 DVD-Ig 생성을 위해 선택될 수 있다.
- [0219] 조직 교차-반응성 연구는 최종 DVD-Ig 작제물을 사용하여 반복되어야만 하지만 이들 연구는 본원에 명시된 바와 동일한 프로토콜을 따르고 이들은 평가를 위해 보다 복잡한데 그 이유는 임의의 결합이 2개의 모 항체중 어느 하나에 기인할 수 있고 임의의 설명되지 않은 결합이 복합체 항원 경쟁 연구를 사용하여 확인될 필요가 있다.
- [0220] DVD-Ig와 같은 다특이적 분자를 사용한 복잡한 조직 교차반응성 연구의 착수는 2개의 모 항체가 (1) 예상되지 않은 조직 교차 반응성 발견의 부재 및 (2) 상응하는 사람과 독성 동물 중 조직간의 조직 교차 반응성의 적당한 유사성에 대해 선별되는 경우 크게 단순화된다는 것은 명백하다.
- [0221] **B.12 특이성 및 선택성:**
- [0222] 목적하는 특이성 및 선택성을 갖는 DVD-Ig 분자를 제조하기 위해, 목적하는 특이성 및 선택성 프로파일 유사한 모 mAb를 제조하고 선택할 필요가 있다. 이를 고려하여, 모 mAb는 동일한 항체이거나 또는 상이한 항체일 수 있다.
- [0223] DVD-Ig를 사용하는 특이성 및 선택성에 대한 결합 연구는 4개 이상의 결합 부위(2개 각각은 2개 항원에 대한 것 이다)로 인해 복잡할 수 있다. 간략하게, DVD-Ig와 함께 효소 결합 면역 흡착 측정법(ELISA), BIAcore, KinExA 또는 기타 상호작용 연구는 DVD-Ig 분자에 대한 1개 또는 2개 이상의 항원 결합을 모니터할 필요가 있다. BIAcore 기술은 다중 항원의 연속적 독립적 결합을 해결할 수 있지만 KinExA와 같은 ELISA 또는 보다 근대의 기술을 포함하는 보다 통상적인 방법은 할 수 없다. 따라서, 각각의 모 항체의 주의깊은 특징 분석은 중요하다. 각각의 개별 항체가 특이성에 대해 특성 분석된 후, DVD-Ig 분자에서 개별 결합 부위의 특이성 보유에 대한 확인은 크게 단순화된다.
- [0224] DID-Ig의 특이성을 결정하는 복잡한 연구 착수는 2개의 모 항체가 DVD-Ig로 배합되기 전에 특이성에 대해 선택 되는 경우 크게 단순화된다는 것은 명백하다.
- [0225] 항원-항체 상호작용 연구는 많은 전형적인 단백질 상호작용 연구, ELISA, 질량 분광기, 화학적 교차-결합, 광 산란을 갖는 SEC, 평형 투석, 겔 침투, 한외여과, 겔 크로마토그래피, 대형-지대 분석 SEC, 미세정제용 한외원 심분리 (침강 평형), 분광 방법, 적정 마이크로칼로리측정기, 침강 평형 (분석 한외원심분리기), 침강 속도(분석적 원심분리기에서), 및 표면 플라즈몬 공명(BIAcore를 포함)을 포함하는 임의의 형태를 취할 수 있다. 관련 문헌은 문헌["Current Protocols in Protein Science", -Coligan, J. E. et al. (eds.) Volume 3, chapters 19 and 20, published by John Wiley & Sons Inc., and "Current Protocols in Immunology", Coligan, J. E. et al. (eds) published by John Wiley & Sons Inc., 및 본원에 포함된 관련 문헌]을 포함한다.
- [0226] 전혈에서 사이토킨 방출: 사람 혈액 세포의 mAb의 상호작용은 사이토킨 방출 분석에 의해 조사될 수 있다(문헌 참조: Wing, M. G. (1995) Therapeut. Immunol. 2(4): 183-190; "Current Protocols in Pharmacology", Enna, S. J. et al. (eds.) published by John Wiley & Sons Inc; Madhusudan, S. (2004) Clin. Cancer Res. 10(19): 6528-6534; Cox, J. (2006) Methods 38(4): 274-282; Choi, I. (2001) Eur. J. Immunol. 31(1): 94-106). 간략하게, 다양한 농도의 mAb는 24시간동안 사람 전혈과 함께 항온처리한다. 시험된 농도는 환자에서 전형적인 혈액 수준과 유사한(100 ng/ml - 100 µg/ml을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 최종 농도를 포함하는 광 범위를 포괄해야만 한다. 항온처리 후, 상등액 및 세포 용해물은 IL-1Rα, TNF-α, IL-1b, IL-6 및 IL-8의 존재에 대해 분석하였다. mAb에 대해 생성된 사이토킨 농도 프로파일은 음성 사람 IgG 대조군과 양성 LPS 또는 PHA 대조군에 의해 생성된 프로파일과 비교하였다. 세포 상등액과 세포 용해물 둘다 기원의 mAb에 의해 나타낸 사이토킨 프로파일은 대조군 사람 IgG와 비교할 수 있었다. 하나의 양태에서, 모노클로날 항체는 염증 사이토킨을 자발적으로 방출하기 위해 사람 혈액 세포와 상호작용하지 않는다.

[0227] DVD-Ig에 대한 사이토킨 방출 연구는 4개 이상의 결합 부위로 인해 복잡하고 2개 각각은 각각의 항원에 대한 것이다. 간략하게, 사이토킨 방출 연구는 본원에 기재된 바와 같이 전혈 또는 기타 세포 시스템에 대해 전체 DVD-Ig 분자의 효과를 측정하는 것이지만 분자의 어느 부분이 사이토킨 방출을 유발하는지를 해결할 수 있다. 일단 사이토킨 방출이 검출된 경우, 몇몇 보조 정제 세포 성분이 사이토킨 방출 자체를 유발할 수 있기 때문에 DVD-Ig 제제의 순도가 확인되어야만 한다. 순도가 문제가 아닌 경우, DVD-Ig(Fc 부분의 제거, 결합 부위의 분리 등을 포함하지만 이에 제한되지 않음)의 단편화, 결합 부위 돌연변이유발 또는 기타 방법은 임의의 관찰을 평활화 하는데 사용될 필요가 있을 수 있다. 이러한 복잡한 과정은 2개의 모 항체가 DVD-Ig로 배합되기 전에 사이토킨 방출의 부제를 위해 선택되는 경우 크게 단순화된다는 것은 명백하다.

[0228] **B.13 독성학적 연구를 위한 다른 종에 대한 교차 반응성:**

[0229] 하나의 양태에서, 개별 항체는 적당한 tox 종, 예를 들어, 시노물구스 몽키에 대해 충분한 교차-반응성을 갖는 것으로 선택된다. 모 항체는 유사 종 표적(즉, 시노물구스 몽키)에 결합하고 적당한 반응(조절, 중화, 활성화)을 유발할 필요가 있다. 하나의 양태에서, 유사 종 표적에 대한 교차 반응성(친화성/효능)은 사람 표적의 10배 이내이어야만 한다. 실제로, 모 항체는 마우스, 랫트, 개, 원숭이(및 기타 사람을 제외한 영장류) 및 질환 모델 종(즉, 천식 모델에 대한 양)을 포함하는 다양한 종양에 대해서 평가된다. 모 모노클로날 항체 기원의 tox 종에 대해 허용가능한 교차 반응성은 동일한 종에서 DVD-Ig-Ig의 향후 독성학 연구를 허용한다. 그 이유 때문에, 2개의 모 모노클로날 항체는 통상의 tox 종에 대해 허용가능한 교차 반응성을 가져 동일한 종에서 DVD-Ig의 독성학 연구를 가능하게 해야 한다.

[0230] 모 mAb는 당업계에서 널리 공지되어 있는 특정 표적에 결합하는 다양한 모노클로날 항체로부터 선택될 수 있다. 모 항체들은 동일한 항체이거나 또는 상이한 항체일 수 있다. 이들은 항-TNF 항체(미국 특허 제6,258,562호), 항-IL-12 및/또는 항-IL-12p40 항체(미국 특허 제6,914,128호); 항-IL-18 항체 (미국 특허 공개 제 2005/0147610), 항-C5, 항-CBL, 항-CD147, 항-gp120, 항-VLA-4, 항-CD11a, 항-CD18, 항-VEGF, 항-CD40L, 항-CD-40(예: PCT 공개 제WO 2007/124299호 참조), 항-Id, 항-ICAM-1, 항-CXCL13, 항-CD2, 항-EGFR, 항-TGF-베타 2, 항-HGF, 항-Met, 항 DLL-4, 항-NPR1, 항-PLGF, 항-ErbB3, 항-E-셀렉틴, 항-Fact VII, 항-Her2/neu, 항-F gp, 항-CD11/18, 항-CD14, 항-ICAM-3, 항-RON, 항-SOST, 항 CD-19, 항-CD80(예를 들어, PCT 공개 제WO 2003/039486호 참조), 항-CD4, 항-CD3, 항-CD23, 항-베타2-인테그린, 항-알파4베타7, 항-CD52, 항-HLA DR, 항-CD22(예: 미국 특허 제5,789,544호 참조), 항-CD20, 항-MIF, 항-CD64 (FcR), 항-TCR 알파 베타, 항-CD2, 항-Hep B, 항-CA 125, 항-EpCAM, 항-gp120, 항-CMV, 항-gpIIbIIIa, 항-IgE, 항-CD25, 항-CD33, 항-HLA, 항-IGF1,2, 항 IGFR, 항-VNR인테그린, 항-IL-1알파, 항-IL-1베타, 항-IL-1 수용체, 항-IL-2 수용체, 항-IL-4, 항-IL-4 수용체, 항-IL5, 항-IL-5 수용체, 항-IL-6, 항-IL-8, 항-IL-9, 항-IL-13, 항-IL-13 수용체, 항-IL-17 및 항-IL-23을 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌참조: Presta, L. G. (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731-6 및 [www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html)).

[0231] 모 mAb는 또한 임상적 시험용 또는 임상 사용 개발용으로 승인된 다양한 치료학적 항체로부터 선택될 수 있다. 당해 치료학적 항체는 리툭시마브 (Rituxan®

, IDEC/Genentech/Roche) (문헌참조: 예를 들어 미국 특허 제5,736,137호), 비호지킨 림프종을 치료하기 위해 승인된 키메라 항-CD20 항체; HuMax-CD20, Genmab에 의해 현재 개발된 항-CD20, 미국 특허 제5,500,362호에 기재된 항-CD20 항체, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), 및 PRO70769 (PCT 출원 제PCT/US2003/040426호), 트라스투즈마브 (Herceptin®

, Genentech) (문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,677,171호), 유방암을 치료하기 위해 승인된 사람화된 항-Her2/neu 항체; Genentech에 현재 개발된 퍼투즈마브 (rhuMab-2C4, Omnitarg®

); 항 -Her2 항체(미국 특허 제4,753,894호); 세룩시마브 (Erbix®

, Imclone) (미국 특허 제4,943,533호; PCT 공개 제WO 96/40210호), 다양한 암에 대해 임상 시험중의 키메라 항-EGFR; Abgenix-Immunex-Amgen에 의해 현재 개발된 ABX-EGF(미국 특허 제6,235,883호) ; Genmab에 의해 현재 개발된 HuMax- EGF (미국 특허 제7,247,301호); 425, EMD55900, EMD62000, 및 EMD72000 (Merck KGaA) (미국 특허 제5,558,864호; Murthy, et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-60; Rodeck, et al. (1987) J. Cell. Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough, et al. (1991) Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT 공개 제WO 95/20045호; Modjtahedi, et al. (1993) J. Cell. Biophys.

22(1-3):129-46; Modjtahedi, et al. (1993) Br. J. Cancer. 67(2):247-53; Modjtahedi, et al. (1996) Br. J. Cancer 73(2):228-35; Modjtahedi, et al. (2003) Int. J. Cancer 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba (미국 특허 제5,891,996호; 미국 특허 제 6,506, 883호; Mateo, et al. (1997) Immunotechnol. 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT 공개 제WO 01/62931 A2호); 및 SC100 (Scancell) (PCT 공개 제WO 01/88138호); B-세포 만성 림프구 백혈병의 치료를 위해 현재 승인된 사람화 된 모노클로날 항체인 알렘투주마브 (Campath®

, Millenium); 무로모나브-CD3 (Orthoclone OKT3®

), Ortho Biotech/Johnson & Johnson에 의해 개발된 항-CD3 항체, 이브리투모마브 티옥세탄(Zevalin®

), IDEC/Schering AG에 의해 개발된 항-CD20 항체, 겐시투주마브 오조가미신(Mylotarg®

), Celltech/Wyeth에 의해 개발된 항-CD33(p67 단백질), 알레파셉트(Amevive®

), Biogen에 의해 개발된 항-LFA-3 Fc 융합체, Centocor/Lilly에 의해 개발된 아브식시마브(ReoPro®

), Novartis에 의해 개발된 바실릭시마브(Simulect®

), Medimmune에 의해 개발된 팔리비주마브(Synagis®

), 인플릭시마브 (Remicade®

), Centocor에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 아달리우마브 (Humira), Abbott에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 후미카데®

, Celltech에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 골리우마브(CNTO-148), Centocor에 의해 개발된 완전한 사람 TNF 항체, 에타네르셉트 (Enbrel®

), an Immunex/Amgen에 의해 개발된 p 75 TNF 수용체 Fc 융합체, 레너르셉트, Roche에 의해 이전에 개발된 p55TNF 수용체 Fc 융합체, ABX-CBL, Abgenix에 의해 개발된 항-CD147 항체, ABX-IL8, Abgenix에 의해 개발된 항-IL-8 항체, ABX-MA1, Abgenix에 의해 개발된 항-MUC18 항체, 펌투모마브 (R1549, 90Y-muHMFg1), Antisoma에 의해 개발중인 항-MUC1, 테렉스 (R1550), Antisoma에 의해 개발된 항-MUC1 항체, Antisoma에 의해 개발된 AngioMab(AS1405), Antisoma에 의해 개발된 HuBC-1, Antisoma에 의해 개발된 티오플라틴 (AS1407), Antegen®

(나탈리주마브), Biogen에 의해 개발된 항-알파-4-베타 -1 (VLA-4) 및 알파 -4-베타 -7 항체, VLA-1 mAb, Biogen에 의해 개발된 항-VLA-1 인테그린 항체, LTBR mAb, Biogen에 의해 개발된 항 림포톡신 베타 수용체 (LTBR) 항체, CAT-152, Cambridge Antibody Technology에 의해 개발된 항-TGF-2 항체, ABT 874(J695), Cambridge Antibody Technology 및 Abbott에 의해 개발된 항-IL-12 항체, CAT-192, Cambridge Antibody Technology 및 Genzyme에 의해 개발된 항-TGF1 항체, CAT-213, Cambridge Antibody Technology에 의해 개발된 항-에오탁신1 항체, LymphoStat-B®

, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences Inc.에 의해 개발된 항- Blys 항체, TRAIL-R1mAb, Cambridge Antibody Technology 및 Human Genome Sciences, Inc.에 의해 개발된 항-TRAIL-R1 항체, Avastin®

베바시주마브, rhuMAB-VEGF, Genentech에 의해 개발된 항-VEGF 항체, Genentech에 의해 개발된 항-HER 수용체 계열 항체, 항-조직 인자 (ATF), Genentech에 의해 개발된 항-조직 인자 항체, Xolair(오말리주마브), Genentech에 의해 개발된 항-IgE 항체, Raptiva®

(에팔리주마브), Genentech 및 Xoma에 의해 개발된 항-CD11a 항체, Genentech 및 Millenium Pharmaceuticals에 의해 개발된 MLN-02 항체 (이전에는 LDP-02), HuMax CD4, Genmab에 의해 개발된 항-CD4 항체, HuMax-IL15,

Genmab 및 Amgen에 의해 개발된 항-IL15 항체, Genmab 및 Medarex에 의해 개발된 HuMax-Inflam, HuMax-암, Genmab 및 Medarex 및 Oxford GcoSciences에 의해 개발된 항-해파라나제 I 항체, Genmab 및 Amgen에 의해 개발된 HuMax-림프종, Genmab에 의해 개발된 HuMax-TAC, IDEC-131, 및 IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-CD40L 항체, IDEC-151 (클레놀릭시마브), IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-CD4 항체, IDEC-114, IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-CD80 항체, IDEC-152, IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-CD23, IDEC Pharmaceuticals에 의해 개발된 항-대식세포 이동 인자(MIF) 항체, BEC2, Imclone에 의해 개발된 항-이디오타 입 항체, IMC-1C11, Imclone에 의해 개발된 항-KDR 항체, DC101, Imclone에 의해 개발된 항-flk-1, Imclone에 의해 개발된 항-VE 캐드헤린 항체, CEA-Cide<sup>®</sup>

(라베투주마브), Immunomedics에 의해 개발된 항-암배아 항원(CEA) 항체, LymphoCide<sup>®</sup>

(에프라투주마브), Immunomedics에 의해 개발된 항-CD22 항체, Immunomedics에 의해 개발된 AFP-Cide, Immunomedics에 의해 개발된 골수종 Cide, Immunomedics에 의해 개발된 LkoCide, Immunomedics에 의해 개발된 ProstaCide, MDX-010, Medarex에 의해 개발된 항-CTLA4 항체, MDX-060, Medarex에 의해 개발된 항-CD30 항체, Medarex에 의해 개발된 MDX-070, Medarex에 의해 개발된 MDX-018, Osidem<sup>®</sup>

(IDM-1), 및 Medarex 및 Immuno-Designed Molecules에 의해 개발된 항-Her2 항체, HuMax<sup>®</sup>

-CD4, Medarex 및 Genmab에 의해 개발된 항-CD4 항체, HuMax-IL15, Medarex 및 Genmab에 의해 개발된 항-IL15 항체, CNTO 148, Medarex 및 Centocor/J&J에 의해 개발된 항-TNF  $\alpha$  항체, CNTO 1275, Centocor/J&J에 의해 개발된 항-사이토킨 항체, MOR101 및 MOR102, MorphoSys에 의해 개발된 항-세포간 부착 분자-1(ICAM-1)(CD54) 항체, MOR201, MorphoSys에 의해 개발된 항-섬유아세포 성장 인자 수용체 3(FGFR-3), Nuvion<sup>®</sup>

(비실리주마브), Protein Design Labs에 의해 개발된 항-CD3 항체, HuZAF<sup>®</sup>

, Protein Design Labs에 의해 개발된 항-감마 인터페론 항체, Protein Design Labs에 의해 개발된 항- $\alpha 5\beta 1$  인테그린, Protein Design Labs에 의해 개발된 항-IL-12, ING-1, Xoma에 의해 개발된 항-Ep-CAM 항체, Xolair<sup>®</sup>

(Omalizumab), Genentech 및 Novartis에 의해 개발된 사람화된 항-IgE 항체, 및 MLN01, Xoma에 의해 개발된 항-베타2 인테그린 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또 다른 양태에서, 치료제는 KRN330 (Kirin); huA33 항체 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (알파 V 인테그린, Centocor); MEDI-522 (알파 V $\beta$ 3 인테그린, Medimmune); 볼록이시마브 (알파 V $\beta$ 1 인테그린, Biogen/PDL); 사람 mAb 216 (B 세포 당화 에피토프, NCI); BiTE MT103 (이특이적 CD19 x CD3, Medimmune); 4G7xH22 (이특이적 BcellxFc감마R1, Medarex/Merck KGa); rM28 (Bispecific CD28 x MAPG, 유럽 특허 제EP1444268호); MDX447 (EMD 82633) (이특이적 CD64 x EGFR, Medarex); 카툼악소마브(Catumaxomab)(레모마브) (이특이적 EpCAM x 항-CD3, Trion/Fres); 에르투마속마브(Ertumaxomab) (이특이적 HER2/CD3, Fresenius Biotech); 오레고보마브 (OvaRex) (CA-125, ViRexx); 렌카렉스(Rencarex)<sup>®</sup>

(WX G250) (카보닉 안하이드라제 IX, Willex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (엔도글린), Tracon); BMS-663513 (CD137 효능제, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); 시플리주마브(MEDI-507) (CD2, Medimmune); 오파투무마브(Ofatumumab) (Humax-CD20) (CD20, Genmab); 리톡시마브(Rituximab) (Rituxan) (CD20, Genentech); 벨투주마브(veltuzumab) (hA20) (CD20, Immunomedics); 에프라투주마브(Epratuzumab) (CD22, Amgen); 루밀릭시마브(lumiliximab) (IDEC 152) (CD23, Biogen); 무로모나브(muromonab)-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (CD3 fc 수용체, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentics); SGN-33 (린투주마브) (CD33, Seattle Genentics); 자놀리무마브(Zanolimumab) (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentics); Campath1h (알렘투주마브(Alemtuzumab)) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); 갈릭시마브 (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (절단된 콜라겐, 트라콘); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); 이필리무마브 (MDX-010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb); 트레멜리무마브(Tremelimumab)(Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (마파투무마브(Mapatumumab)) (DR4 TRAIL-R1 효능제, Human Genome Science /Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); 아포마브(Apomab) (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (렉사투무마브

(lexatumumab)) (DR5 TRAIL-R2 효능제, HGS); 세톡시마브(Cetuximab) (Erbix) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); 니모투주마브(EGFR, YM Bio); 파니투무마브(Panitumumab) (Vectabix) (EGFR, Amgen); 잘루투무마브(Zalutumumab) (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); 아데카투무마브(adecatumumab) (MT201) (Epcam, Merck); 에드레콜로마브(edrecolomab) (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (플레이트 수용체 a, Morphotech); KW-2871 (갱글리오사이드 GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCgb, Celldex); 트라스투주마브(Trastuzumab) (Herceptin) (HER2, Celldex); 페르투주마브(rhuMab 2C4) (HER2 (DI), Genentech); 아폴리주마브(apolizumab) (HLA-DR 베타쇄, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); 항-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R, Biogen); Mik-베타-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); 항-KIR (1-7F9) (킬러 세포 Ig형 수용체(KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTβR, Biogen); HuHMF1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (N-연결된 탄수화물 에피토프, Raven); CAL (파라티로이드 호르몬-관련 단백질(PTH-rP), University of California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFRa, Imclone); 바비톡시마브 (포스포티딜세린, 페레그린); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 (TGFb (pan) 억제제 (IgG4), Genzyme); 인플릭시마브(Infliximab) (Remicade) (TNFa, Centocor); A27.15 (트랜스페린 수용체, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (트랜스페린 수용체, Salk Institute); 베바시주마브(Bevacizumab) (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab-, PCT 공개 제WO/2000/034337호, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone)을 포함한다.

[0232] **B. DVD 분자의 작제:**

[0233] 이원 가변 도메인 면역글로불린 (DVD-Ig) 분자는 동일하거나 또는 상이할 수 있는 2개의 모 mAb 기원의 2개의 상이한 경쇄 가변 도메인(VL)이 직접적으로 탠덤으로 연결되거나 재조합 DNA 기술에 의해 짧은 링커를 통해 연결되고 이어서 경쇄 불변 도메인, 부가적으로는 Fc 영역이 연결되도록 디자인한다. 유사하게, 중쇄는 탠덤으로 연결된 2개의 중쇄 가변 도메인(VH)에 이어서 불변 도메인 CH1 및 Fc 영역을 포함한다 (도 1a).

[0234] 가변 도메인은 상기된 방법중 어느 하나에 의해 생성된 모 항체로부터 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득될 수 있다. 하나의 양태에서, 가변 도메인은 쥐 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다. 또 다른 양태에서, 가변 도메인은 CDR 접목되거나 사람화된 가변 중쇄 또는 경쇄 도메인이다. 하나의 양태에서, 가변 도메인은 사람 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다.

[0235] 하나의 양태에서, 제1 및 제2 가변 도메인은 재조합 DNA 기술을 사용하여 서로 직접적으로 연결된다. 또 다른 양태에서, 가변 도메인은 링커 서열을 통해 연결된다. 하나의 양태에서, 2개의 가변 도메인이 연결된다. 3개 이상의 가변 도메인은 또한 직접적으로 또는 링커 서열을 통해 연결될 수 있다. 가변 도메인은 동일한 항원에 결합할 수 있거나 상이한 항원에 결합할 수 있다. 본 발명의 DVD-Ig 분자는 수용체의 리간드 결합 도메인, 또는 효소의 활성 도메인과 같은 하나의 면역글로불린 가변 도메인 및 하나의 비-면역글로불린 가변 도메인을 포함할 수 있다. DVD-Ig 분자는 또한 2개 이상의 비-Ig 도메인을 포함할 수 있다.

[0236] 링커 서열은 단일 아미노산 또는 폴리펩타이드 서열일 수 있다. 하나의 양태에서, 링커 서열은 AKTTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTTPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTTPKLGG(서열번호 3); SAKTTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP (서열번호 6); RADAAPTVS (서열번호 7); RADAAAAGGPGS (서열번호 8); RADAAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> (서열번호 9), SAKTTPKLEEGEFSEARV (서열번호 10); ADAAP (서열번호 11); ADAAPTVSIFPP (서열번호 12); TVAAP (서열번호 13); TVAAPSVFIFPP (서열번호 14); QPKAAP (서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP (서열번호 16); AKTTPP (서열번호 17); AKTTPPSVTLPLAP (서열번호 18); AKTTAP (서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP (서열번호 20); ASTKGP (서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP (서열번호 22), GGGGGSGGGSGGGGS (서열번호 23); GENKVEYAPALMALS (서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS (서열번호 25); 및 GHEAAVMQVQYPAS (서열번호 26)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 링커이다. 링커 서열의 선택은 여러 Fab 분자의 결정 구조 분석을 기초로 한다. Fab 또는 항체 분자 구조에서 가변 도메인과 CH1/CL 불변 도메인간에는 천연 유연성 연결이 있다. 당해 천연 연결체는 약 10 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하고, 이중 4 내지 6개의 잔기는 V 도메인의 C-말단으로부터 유래된 것이고 4 내지 6개의 잔기는 CL/CH1 도메인의 N-말단으로부터 유래된 것이다. 본 발명의 DVD Ig는 각각 DVD-Ig의 경쇄 및 중쇄에서 링커로서 CL 또는 CH1의 N-말단의 5 내지 6개의 아미노산 잔기 또는 11개 내지 12개의 아미노산 잔기를 사용하여 제조된다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기, 특히 처음 5개 내지 6개의 아미노산 잔기는 강한

2차 구조 없이 루프 형태를 취함에 따라서 2개의 가변 도메인간의 유연성 링커로서 작용할 수 있다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기, 특히 처음 5 내지 6개의 아미노산 잔기는 강한 2차 구조 없이 루프 형태를 취함에 따라서 2개의 가변 도메인간에 유연성 링커로서 작용할 수 있다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기는 천연 연장의 가변 도메인이므로 이들은 Ig 서열의 일부임으로 링커 및 연결부로부터 잠재적으로 유발되는 면역원성을 크게 감소시킨다.

[0237] 또 다른 링커 서열은 임의의 길이의 CL/CH1 도메인의 임의의 서열(예를 들어, CL/CH1 도메인의 처음 5 내지 12 개의 아미노산 잔기)을 포함할 수 있지만 CL/CH1 도메인의 모든 잔기를 포함하지는 않는다. 경쇄 링커는 C $\kappa$  또는 C $\lambda$ 로부터 비롯될 수 있고; 중쇄 링커는 C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4, C $\alpha$ 1, C $\alpha$ 2, C $\delta$ , C $\epsilon$ , 및 C $\mu$ 를 포함하는 임의의 이소형의 CH1으로부터 비롯될 수 있다. 링커 서열은 또한 Ig-형 단백질 (예를 들어, TCR, FcR, KIR)과 같은 기타 단백질; G/S 기본 서열 (예를 들어, G4S 반복체)(서열번호 29); 힌지 영역 유래 서열 및 기타 단백질 기원의 기타 천연 단백질로부터 유래할 수 있다.

[0238] 하나의 양태에서, 불변 도메인은 재조합 DNA 기술을 사용하여 2개의 연결된 가변 도메인에 연결한다. 하나의 양태에서, 연결된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 중쇄 불변 도메인에 연결하고 연결된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 경쇄 불변 도메인에 연결한다. 하나의 양태에서, 불변 도메인은 각각 사람 중쇄 불변 도메인 및 사람 경쇄 불변 도메인이다. 하나의 양태에서, DVD 중쇄는 추가로 Fc 영역에 연결한다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 또 다른 양태에서, Fc 영역은 사람 Fc 영역이다. 또 다른 양태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD기원의 Fc 영역을 포함한다.

[0239] 또 다른 양태에서, 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드는 조합되어 DVD-Ig 분자를 형성한다. 표 2는 질환을 치료하기 위해, 예를 들어, 암을 치료하기 위해 유용한 표적에 대한 예시적인 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열을 열거한다. 하나의 양태에서, 본 발명은 임의의 배향으로 표 2에 열거된 VH 및/또는 VL 영역중 2개 이상을 포함하는 DVD를 제공한다.

## 표 2

DVD-Ig을 생성하기 위한 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열의 목록

| 서열<br>번호 | ABT<br>고유 ID | 단백질 영역             | 서열<br>1234567890123456789012345678901234567890                                                                                         |
|----------|--------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 30       | AB001VH      | VH CD20            | QVQLQQPGAEIVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT<br>PGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY<br>MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTTVTS<br>A   |
| 31       | AB001VL      | VL CD20            | QIVLSQSPAILSPSPGKVTMTCRASSVSYIHWFQKQPG<br>SSPKPWYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE<br>DAATYYCQQTNPPTFGGGTKLEIKR                          |
| 32       | AB003VH      | VH EGFR<br>(서열 1)  | QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIR<br>QSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSKTQF<br>SLKLSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMTVTSS       |
| 33       | AB003VL      | VL EGFR<br>(서열 1)  | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQKQK<br>GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTTISLQF<br>EDIATYFCQHPDHLPLAFGGGKVEIKR                       |
| 34       | AB004VH      | VH HER2<br>(서열 1)  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA<br>PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY<br>LQMNSLRADTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTITVTVSS       |
| 35       | AB004VL      | VL HER2<br>(서열 1)  | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKQK<br>GKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQF<br>EDFATYYCQHYTTPPTFGGQTKVEIKR                       |
| 36       | AB006VH      | VH CD-19<br>(서열 1) | QVQLQQSGAEIVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQR<br>PGQGLEWIGQIWPNGDTSYNGKFKGKATLTAESSSTAY<br>MQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTV<br>TVSS |

[0240]

| 서열<br>번호 | ABT<br>고유 ID | 단백질 영역             | 서열<br>123456789012345678901234567890                                                                                                   |
|----------|--------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 37       | AB006VL      | VL CD-19<br>(서열 1) | DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWY<br>QQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIH<br>PVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKR            |
| 38       | AB011VH      | VH IGF1R<br>(서열 1) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWRQA<br>PGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSTTLTY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGT<br>TVSS |
| 39       | AB011VL      | VL IGF1R<br>(서열 1) | DIQMTQFPSSLSASVGDRTIITCRASQGIRNDLGWYQQKP<br>GKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP<br>EDFATYYCLQHNSYPCSFQGGTKLEIKR                    |
| 40       | AB033VH      | VH EGFR<br>(서열 2)  | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS<br>PGKGLEWLVGIWSSGNTDYNPTFTSRSLINKDNKSQVFF<br>KMNSLQSDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVA             |
| 41       | AB033VL      | VL EGFR<br>(서열 2)  | DILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQQRT<br>NGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVES<br>EDIADYYCQNNWPTTFGAGTKLEIKR                       |
| 42       | AB064VH      | VH EGFR<br>(서열 3)  | QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSIDFAWNWIRQ<br>PPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFF<br>LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVTVA               |
| 43       | AB064VL      | VL EGFR<br>(서열 3)  | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIITCHSSQDINSNIGWLQQKP<br>GKSFGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISLQP<br>EDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR                    |
| 44       | AB121VH      | VH NKG2D           | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA<br>PGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTIFYDYWGQGTITVTS<br>S |
| 45       | AB121VL      | VL NKG2D           | QSALTQPASVSGSPGQSIITISCSGSSNIGNAVNWWYQQL<br>PGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFSGSGSGTSAFLAISGLQ<br>SEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG                 |

[0241]

[0242]

특정 표적에 결합할 수 있는 특이적 DVD-Ig 분자 및 이를 제조하는 방법의 상세한 설명은 하기의 실험부에서 제  
공된다.

[0243]

### C. DVD 단백질의 제조

[0244]

본 발명의 결합 단백질은 당업계에서 공지된 임의의 다수의 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포  
로부터 발현되고 여기서, DVD 중쇄 및 DVD 경쇄를 암호화하는 발현 벡터는 표준 기술에 의해 숙주 세포로 형질  
감염된다. "형질감염"이란 용어의 다양한 형태는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에 외인성 DNA를 도입시키  
는데 일반적으로 사용되는 다양한 기술, 예컨대 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-텍스트란 형질감염 등을 포함하  
는 것으로 간주한다. 본 발명의 DVD 단백질은 원핵생물 숙주 세포 또는 진핵생물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있  
지만, 진핵생물 예를 들어, 포유동물 숙주 세포에서의 DVD 단백질의 발현이 바람직하는데, 그 이유는 이러한 진핵  
생물 세포(특히 포유동물 세포)가 적당한 폴딩을 이루어 면역학적 활성인 DVD 단백질을 회합(assembly)하여 분  
비하는데 원핵생물 세포보다 더 적당하기 때문이다.

[0245]

본 발명의 재조합 항체를 발현하기에 바람직한 포유동물 숙주 세포에는 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(예컨대,  
Kaufman, R.J. and Sharp, P.A.(1982) Mol.Biol. 159:601-621에 기술된 바와 같은 DHFR 선택성 마커와 함께 사  
용된, Urlaub and Chasin(1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:4216-4220에 기술된 dhfr-CHO 세포), NS0 골수종  
세포, COS 세포 및 SP2 및 PER.C6 세포가 있다. DVD 단백질을 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주  
세포에 도입되면, DVD 단백질은 숙주 세포에서 DVD 단백질이 발현되기에 또는 바람직하게는 숙주 세포가 증식되  
는 배양 배지로 DVD 단백질이 분비되기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양하여 생산한다. DVD 단백질은 표준  
단백질 정제법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

- [0246] 본 발명의 DVD 단백질의 재조합 발현을 위해 바람직한 시스템에서, DVD 중쇄 및 DVD 경쇄 둘다를 암호화하는 재조합 발현 벡터는 인산칼슘 매개 형질감염에 의해 dhfr-CHO 세포로 도입된다. 재조합 발현 벡터내에서, DVD 중쇄 및 경쇄는 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 인자에 각각 작동적으로 결합되어 상기 유전자의 높은 전사율을 유도한다. 또한, 재조합 발현 벡터는 DHFR 유전자를 보유하며, 이 유전자는 메토타렉세이트 선별/증폭을 통해 상기 벡터로 형질감염된 CHO 세포를 선별할 수 있게 해준다. 선별된 형질전환 숙주 세포는 DVD 중쇄 및 경쇄를 발현할 수 있도록 배양하고, 이러한 배양 배지로부터 완전한 DVD를 회수한다. 재조합 발현 벡터 제조, 숙주 세포 형질감염, 형질전환체 선별, 숙주 세포 배양 및 배양 배지로부터 DVD의 회수에는 표준 분자 생물학 기술을 사용한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 본 발명의 DVD 단백질이 합성될 때까지 적당한 배양 배지에서 배양하여 본 발명의 DVD 단백질을 합성하는 방법을 제공한다. 이 방법은 추가로 배양 배지로부터 DVD 단백질을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0247] DVD-Ig의 중요한 특징은 이것이 통상적인 항체와 유사한 방법으로 제조되고 정제될 수 있다는 것이다. DVD-Ig의 제조는 목적하는 이원-특이적 활성을 갖는 균질의 단일 주요 생성물을 유도하고 불변 영역의 임의의 서열의 변형 또는 임의의 종류의 화학적 변형이 필요 없다. "이특이적", "다특이적" 및 "다특이적 다가"의 완전한 길이의 결합 단백질을 제조하기 위해 이전에 기재된 방법은 단일의 주요 생성물을 유도하지 못하고 대신 어셈블리된 불활성, 단일 특이적, 다특이적, 다가, 완전한 길이의 결합 단백질 및 다가의 완전한 길이의 결합 단백질 및 상이한 결합 부위가 조합된 다가의 완전한 길이의 결합 단백질을 유도한다. 일례로서, 문헌[참조:Miller 및 Presta (PCT 공보 WO2001/077342(A1))]에 기재된 디자인을 기초로, 16개의 가능한 중쇄 및 경쇄의 조합이 있다. 결과적으로 단백질의 단지 6.25%만이 목적하는 활성 형태에 있을 가능성이 있으며, 다른 15개 조합과 비교하여 주요 생성물 또는 단일 1차 생성물이 아니다. 전형적으로 대규모 제조에 사용되는 표준 크로마토그래피 기술을 사용한 불활성 및 부분 활성 형태의 단백질로부터 완전한 활성 형태의 단백질의 분리는 아직 입증되어야만 한다.
- [0248] 놀랍게도, 본 발명의 "이원 특이적 다가 완전한 길이의 결합 단백질"의 디자인은 주로 목적하는 "이원-특이적 다가의 완전한 길이의 단백질"로 어셈블리하는 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 유도한다.
- [0249] 어셈블리되고 발현된 이원 가변 도메인 면역글로불린 분자중 50% 이상, 바람직하게는 75% 이상 및 보다 바람직하게는 90% 이상은 목적하는 이원-특이적 4가 단백질이다. 본 발명의 당해 측면은 특히, 본 발명의 상업적 용도를 증진시킨다. 따라서, 본 발명은 "이원-특이적 4가 완전한 길이의 결합 단백질"의 단일 주요 생성물을 유도하는 단일 세포에서 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 방법을 포함한다.
- [0250] 본 발명은 단일 세포에서 "이원 특이적 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 유도하는, 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 바람직한 방법을 제공하고 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 50% 초과와 모든 어셈블리된 단백질이다.
- [0251] 본 발명은 단일 세포에서 "이원 특이적 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 유도하는, 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 바람직한 방법을 제공하고 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 75% 초과와 모든 어셈블리된 단백질이다.
- [0252] 본 발명은 단일 세포에서 "이원 특이적 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 유도하는, 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시키기 위한 바람직한 방법을 제공하고 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 90% 초과와 모든 어셈블리된 단백질이다.
- [0253] **II. 유도체화된 DVD 결합 단백질:**
- [0254] 일 양태는 본 발명의 결합 단백질이 유도체화되거나 또는 다른 기능성 분자(예컨대, 다른 펩타이드 또는 단백질)에 결합된 표지된 결합 단백질을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 표지된 결합 단백질은 본 발명의 결합 단백질(화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유 연합 등에 의해)을 하나 이상의 다른 분자 실체, 예컨대 다른 항체(예, 이특이적 항체 또는 이중항체), 검출성 제제, 세포독성제, 약제 및/또는 다른 분자와 결합 단백질의 연합을 매개할 수 있는 단백질이나 펩타이드(예컨대, 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그) 등에 기능적으로 연결시켜 수득할 수 있다.
- [0255] 본 발명의 결합 단백질이 유도체화될 수 있는 유용한 검출성 제제에는 형광 화합물이 포함된다. 검출성 형광 제제의 예에는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설폰일 클로라이드, 피코에리트린 등이 있다. 또한, 결합 단백질은 검출성 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코스 옥시다제 등에 의해 유도체화될 수 있다. 결합 단백질이 검출성 효소로 유도체화된 경우

에는, 효소가 검출성 반응 산물을 생산하기 위해 사용하는 추가 시약을 첨가하여 검출한다. 예를 들어, 검출성 제제 서양고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 검출가능한 발색 반응 생성물을 유도한다. 결합 단백질은 또한 비오틴으로 유도체화될 수 있고, 이 경우 아비딘이나 스트렙타비딘 결합의 간접 측정을 통해 검출한다.

[0256] 본 발명의 다른 양태는 결정화된 결합 단백질, 및 이러한 결정을 포함하는 제형 및 조성물을 제공한다. 일 양태에서, 결정화된 결합 단백질은 이에 대응하는 가용성 결합 단백질보다 생체내 반감기가 더 길다. 또 다른 양태에서, 결합 단백질은 결정화 후 생물학적 활성을 보유한다.

[0257] 본 발명의 결정화된 결합 단백질은 당업계에 공지되어 있고 PCT 공보 제WO 02/072636호에 개시된 바와 같이 생산할 수 있다.

[0258] 본 발명의 다른 양태는 항체 또는 이의 항원 결합부가 하나 이상의 탄수화물 잔기를 포함하는 당화된 결합 단백질을 제공한다. 생체내 생산된 초기 단백질은 해독후 변형으로 알려진 추가 프로세싱으로 처리될 수 있다. 구체적으로, 당(글리코실) 잔기는 당화로 알려진 방법에 의해 효소적으로 첨가될 수 있다. 그 결과 수득되는 공유 결합된 올리고사카라이드 측쇄를 보유한 단백질은 당화된 단백질 또는 당단백질로서 공지되어 있다. 항체는 가변성 도메인 뿐만 아니라 Fc 도메인에 하나 이상의 탄수화물 잔기를 갖는 당단백질이다. Fc 도메인내 탄수화물 잔기는 Fc 도메인의 이펙터 기능에 중요한 효과를 나타내고 항체의 항원 결합 또는 반감기에 최소의 효과를 나타낸다(Jefferis, R. (2005) *Biotechnol. Prog.* 21: 11 - 16). 대조적으로, 가변성 도메인의 당화는 항체의 항원 결합 활성에 효과를 가질 수 있다. 가변성 도메인내 당화는 항체 결합 친화성에 대해 음성 효과를 나타낼 수 있고 이는 입체 장애때문이거나(Co, M.S., et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:1361- 1367), 항원에 대한 친화성을 증가시키기 때문이다(Wallick, S.C., et al. (1988) *Exp. Med.* 168:1099-1109; Wright, A., et al. (1991) *EMBO J.* 10:2717-2723).

[0259] 본 발명의 한 측면은 결합 단백질의 O- 또는 N- 결합된 당화 부위가 돌연변이된 당화 부위 돌연변이체를 제조하는 것에 관한 것이다. 당업자는 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 당해 돌연변이체를 제조할 수 있다. 생물학적 활성을 보유하지만 결합 활성이 증가되거나 감소된 당화 부위 돌연변이체는 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0260] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합부의 당화는 변형된다. 예를 들어, 당화되지 않은 항체가 제조될 수 있다(즉, 항체는 당화되어 있지 않다). 항원에 대한 항체의 특이성을 증가시키기 위해 당화가 변형될 수 있다. 당해 당화 변형은 예를 들어, 항체 서열내 하나 이상의 당화 부위를 변형시킴에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 치환되어 하나 이상의 가변 영역 당화 부위가 제거됨으로써 그 부위에서의 당화가 제거된다. 당해 당화 제거는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 당해 방법은 문헌 [PCT 공보 제WO 2003/016466 A2호, 및 미국 특허 제5,714,350호 및 6,350,861호]에 상세하게 추가로 기재되어 있다.

[0261] 또한, 본 발명의 변형된 결합 단백질은 푸코실 잔기의 양이 감소된 저푸코실화된 항체(문헌참조: Kanda, Y. et al. (2007) *J. Biotech.* 130(3): 300-310) 또는 GlcNAc 구조의 2등분이 증가된 항체와 같은 변형된 유형의 당화를 가질 수 있다. 당해 변형된 당화 패턴은 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 것으로 입증되었다. 당해 탄수화물 변형은 예를 들어, 변형된 당화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시켜 달성될 수 있다. 변형된 당화 기구를 갖는 세포는 당업계에 보고되어 있고 본 발명의 제조합 항체를 발현시켜 변형된 당화를 갖는 항체를 제조하기 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다[Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, 및 유럽 특허 EP 1,176,195호; 및 PCT 공보 제 WO 03/035835호; WO 99/54342 80호].

[0262] 단백질 당화는 당해 단백질의 아미노산 서열, 및 단백질이 발현되는 숙주 세포에 따라 달라진다. 다른 유기체는 다른 당화 효소(예컨대, 글리코실트랜스퍼라제 및 글리코시다제)를 생산하고, 이용할 수 있는 기질(뉴클레오타이드 당)이 다를 수 있다. 이러한 요인으로 인해, 단백질 당화 패턴 및 글리코실 잔기의 조성은 특정 단백질이 발현되는 숙주계에 따라 다를 수 있다. 본 발명에 유용한 글리코실 잔기는 글루코스, 갈락토스, 만노스, 퓨코스, n-아세틸글루코사민 및 시알산 등을 이에 국한됨이 없이 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 이러한 당화된 결합 단백질은 당화 패턴이 사람이도록 글리코실 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

[0263] 당업자에게 공지된 바와 같이, 상이한 단백질 당화는 상이한 단백질 특징을 제공할 수 있다. 예를 들어, 효모와 같은 미생물 숙주에서 생산되고 효모 내인성 경로를 이용하여 당화된 치료 단백질의 효능은 CHO 세포주와 같은 포유동물 세포에서 발현된 동일 단백질 효능에 비해 저하될 수 있다. 이러한 당단백질은 또한 사람 중에서 면역

원성일 수 있고 투여 후 생체내 반감기가 감소될 수 있다. 사람 및 다른 동물에 존재하는 특정 수용체는 특정 당화 잔기를 인식하고 혈류로부터 그 단백질의 신속 제거를 촉진할 수 있다. 다른 부작용으로, 단백질 폴딩, 용해성, 프로테아제에 대한 민감성, 트래픽킹(trafficking), 수송, 구획화, 분비, 다른 단백질이나 인자에 의해 인식, 항원성 또는 알레르기원성 등의 변화를 포함할 수 있다. 따라서, 당업자는 특정 조성과 당화 패턴을 가진 치료 단백질, 예컨대 사람 세포 또는 의도된 피검체 동물의 중 특이적 세포에서 생산되는 것과 동일하거나 적어도 유사한 당화 조성 및 패턴을 가진 치료 단백질을 선호할 수 있다.

[0264] 숙주 세포와 상이한 당화된 단백질의 발현은 숙주 세포의 유전자 변형을 통해 이중 당화 효소를 발현하도록 함으로서 수득될 수 있다. 사람 단백질 당화를 나타내는 항체 또는 항원 결합부는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 당업자라면 제조할 수 있다. 예를 들어, 효모 균주는 비자연발생의 당화 효소를 발현하도록 유전자 변형되어, 이 효모 균주에서 생산된 당화된 단백질(당단백질)이 동물 세포, 특히 사람 세포에서 생산된 것과 동일한 단백질 당화가 수득된 바 있다(미국 특허 제 7,449,308호 및 7,029,872호 및 PCT 공보 제 WO 2005/100584호).

[0265] 결합 단백질 외에도, 본 발명은 또한 본 발명의 당해 결합 단백질에 특이적인 항-이디오타입(항-Id) 항체에 관한 것이다. 항-Id 항체는 일반적으로 또 다른 항체의 항원 결합 영역과 연합된 유일한 결정인자를 인지하는 항체이다. 항-Id는 결합 단백질 또는 CDR 함유 영역으로 동물을 면역화시켜 제조될 수 있다. 면역화된 동물은 면역화 항체의 이디오타입 결정인자를 인지하고 이에 응답하여 항-Id 항체를 생산한다. 이는 DVD-Ig 분자로 2개 이상의 모 항체를 혼입하여 항-이디오타입 항체를 제조하기가 수월하고 당업계에 널리 공지된 방법(예를 들어, BIAcore, ELISA)에 의해 결합 연구를 확인하여 각각의 모 항체의 이디오타입에 대해 특이적인 항-이디오타입 항체가 또한 DVD-Ig와 관련하여 당해 이디오타입(예를 들어, 항원 결합 부위)을 인지함을 입증하기가 수월해짐은 명백하다. DVD-Ig의 2개 이상의 항원 결합부 각각에 대해 특이적인 항-이디오타입 항체는 환자 혈청에서 사람 DVD-Ig의 DVD-Ig 농도를 측정하기 위해 이상적인 시약을 제공한다. DVD-Ig 농도 분석은 "샌드위치 분석 ELISA 포맷"을 사용하여 확립될 수 있고 여기에 사용되는 제1 항원 결합 영역에 대한 항체는 고형상(예를 들어, BIAcore 칩, ELISA 플레이트 등)상에 피복되고 세정 완충액으로 세정되고, 혈청 샘플로 항온처리하고 다시 세정하고 궁극적으로 또 다른 항원 결합 부위에 대한 또 다른 항-이디오타입 항체와 항온처리하고 그 자체를 결합 반응의 정량을 위해 효소로 표지시킨다. 하나의 양태에서, 2개 이상의 상이한 결합 부위를 갖는 DVD-Ig에 대해, 최외곽 부위(불변 영역으로부터 가장 원거리 및 근거리)에 대한 항-이디오타입 항체는 사람 혈청에서 DVD-Ig 농도를 결정하는 것을 도와줄 뿐만 아니라 생체내 분자의 통합성을 입증한다. 각각의 항-Id 항체는 또한 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하기 위한, 소위 항-항-Id 항체를 제조하는 "면역원"으로서 사용될 수 있다.

[0266] 또한, 목적하는 단백질은 다양한 당화 효소를 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포의 라이브러리를 사용하여 발현시킬 수 있음을 당업자라면 잘 알고 있을 것이며, 이에 따라 상기 라이브러리의 구성 숙주 세포는 변형된 당화 패턴을 가진 당해의 단백질을 생산한다. 그 다음, 당업자는 새로운 특정 당화 패턴을 가진 당해의 단백질을 선별하여 분리할 수 있다. 하나의 양태에서, 특별하게 선별된 신규 당화 패턴을 가진 단백질은 생물학적 성질이 개선되거나 변경된 단백질인 것이 바람직하다.

### [0267] III. DVD-Ig의 용도

[0268] 2개 이상의 항원에 결합하는 성질이 있다면, 본 발명의 결합 단백질은 통상의 면역분석법, 예컨대 효소 결합된 면역흡착분석법(ELISA), 방사선면역분석법(RIA) 또는 조직 면역조직화학법을 통해 항원(예컨대 혈청이나 혈장과 같은 생물학적 시료에서)을 검출하는데 사용할 수 있다. DVD-Ig는 결합 또는 미결합된 항체의 검출을 촉진시키기 위해 직간접적으로 검출성 물질로 표지화된다. 적당한 검출성 물질에는 각종 효소, 보결분자족, 형광 물질, 발광 물질 및 방사능 물질이 있다. 적당한 효소의 예에는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제 및 아세틸콜린에스테라제가 있고; 적당한 보결분자족 복합체의 예에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 있으며; 적당한 형광 물질의 예에는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 및 피코에리트린이 있고; 발광 물질의 예에는 루미놀이 있으며; 적당한 방사능 물질의 예에는  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  및  $^{153}\text{Sm}$ 이 있다.

[0269] 본 발명의 결합 단백질은 시험관내 및 생체내 모두에서 항원의 활성을 중화한다. 따라서, 당해 DVD-Ig를 사용하여, 예를 들어, 항원을 함유하는 세포 배양물에서, 사람 피검체 또는 본 발명의 결합 단백질이 교차 반응하는 항원을 갖는 기타 포유동물 피검체에서 항원 활성을 억제할 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 항원 활성이 해로운 질환 또는 장애를 앓는 피검체에서 항원 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질

질은 치료 목적을 위해 사람 피검체에 투여될 수 있다.

- [0270] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원 활성이 해로운 장애"는 장애를 앓는 피검체에서 항원의 존재가 장애의 병리에 관여하거나 장애의 악화에 기여하는 인자이거나 의심되는 것으로 나타나는 질환 및 기타 장애를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 항원 활성이 해로운 장애는 항원 활성의 감소가 장애의 증상 및/또는 진행을 완화시킬 것으로 예상되는 장애이다. 당해 장애는 예를 들어, 장애를 앓는 피검체의 생물학적 유체중에 항원 농도를 증가시켜(예를 들어, 피검체의 혈청, 혈장, 운혈액중의 항원 농도의 증가) 입증될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질로 치료될 수 있는 장애의 비제한적인 예는 하기에서 및 본 발명의 항체의 약제학적 조성물에 관한 부분에서 논의되는 장애를 포함한다.
- [0271] 본 발명의 DVD-Ig는 하나의 항원 또는 다중 항원에 결합할 수 있다. 당해 항원은 하기의 데이터베이스에 열거된 표적물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 표적 데이터베이스는 하기와 같은 목록을 포함한다:
- [0272] 치료학적 표적 (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>);
- [0273] 사이토킨 및 사이토킨 수용체 (<http://www.cytokinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, and
- [0274] [http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF\\_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html](http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html));
- [0275] 케모킨 (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);
- [0276] 케모킨 수용체 및 GPCRs (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>, <http://www.gpcr.org/7tm/>);
- [0277] 올팩터리 수용체 (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);
- [0278] 수용체 (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);
- [0279] 암 표적 (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);
- [0280] 잠재적 항체 표적으로서 분비된 단백질 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);
- [0281] 단백질 키나제 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>), 및
- [0282] 사람 CD 마커 ([http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD\\_table\\_final\\_locked.pdf](http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf)) 및 (Zola H, (2005) Blood 106:3123-6).
- [0283] DVD-Ig는 효능/안정성을 증진시키고/시키거나 환자의 적용 범위를 증가시키기 위해 2개의 상이한 표적을 동시에 차단시키는 치료제로서 유용하다. 당해 표적은 가용성 표적 (예를 들면, TNF) 및 세포 표면 수용체 표적 (예를 들면, VEGFR 및 EGFR)을 포함할 수 있다. 이것은 또한 암 치료를 위해 종양 세포와 T세포(예를 들면, Her2 및 CD3)간에, 또는 자가면역/이식을 위해 자가반응성 세포와 이펙터 세포간에 또는 임의의 특정 질환에서 발병 세포를 제거하기 위한 임의의 표적 세포와 이펙터 세포간에 제시된 세포독성을 유도하는데 사용될 수 있다.
- [0284] 추가로, 동일한 수용체상에 2개의 상이한 에피토프를 표적화하도록 디자인되는 경우, DVD-Ig는 수용체 클러스터링 및 활성화를 유도하기 위해 사용될 수 있다. 이것은 효능성 및 길항성 항-GPCR 치료제를 제조하는데 이득일 수 있다. 이 경우에, DVD-Ig를 사용하여 클러스터링/시그널 전달(2개의 세포 표면 분자) 또는 시그널 전달(하나의 분자상에)을 위해 하나의 세포에 대해 2개의 상이한 에피토프를 표적화할 수 있다. 유사하게, DVD-Ig 분자는 CTLA-4 연결, 및 CTLA-4 세포의 도메인의 2개의 상이한 에피토프(또는 2개 카피의 동일한 에피토프)를 표적화함에 의한 음성 시그널을 유발하여 면역 반응을 하향 조절하도록 디자인될 수 있다. CTLA-4는 다수의 면역학적 장애의 치료를 위해 임상적으로 유효하다. CTLA-4/B7은 세포 주기 진행, IL-2 생성 및 활성화 후 T 세포의 증식을 약화시킴에 의해 T 세포 활성화를 음성으로 조절하고 CTLA-4 (CD152) 관여는 T 세포 활성화를 하향 조절할 수 있고 면역 내성의 유도를 촉진시킬 수 있다. 그러나, CTLA-4의 효능성 항체 관여에 의해 T 세포 활성화를 약화시키는 전략은 CTLA-4 활성화가 연결을 요구하기 때문에 성공적이지 못하였다. CTLA-4/B7의 분자 상호작용은 결정 구조 분석 (Stamper (2001) Nature 410:608)에 의해 입증된 바와 같이 "경사진 지퍼" 정렬로 있다. 그러나, 항-CTLA-4 모노클로날 항체를 포함하는, 현재 시판되는 CTLA-4 결합 시약의 어떠한 것도 연결 성질을 갖지 않는다. 이러한 문제를 해결하기 위한 여러 시도가 있었다. 한 경우에, 세포 구성원 결합 단일쇄 항체가 제조되었고 마우스에서 동형접합성 거부를 억제하였다 (Hwang (2002) J. Immunol. 169:633). 별도의 경우에, CTLA-4에 대한 인공 APC 표면 연결된 단일쇄 항체를 제조하고 T세포 반응을 약화시키는 것으로 입증되었

다(Griffin (2000) J. Immunol. 164:4433). 2개의 경우에, CTLA-4 연결은 인공 시스템에서 막 결합 항체를 밀접하게 국소화시킴으로써 달성되었다. 당해 실험은 CTLA-4 음성 시그널 전달에 의해 면역을 하향조절한다는 개념의 증거를 제공하지만 이들 보고에 사용되는 시약은 치료학적 용도로서 적합하지 않다. 이에 대해, CTLA-4 연결은 CTLA-4 세포의 도메인의 2개의 상이한 에피토프(또는 2개 카피의 동일한 에피토프)에 표적화되는 DVD-Ig 분자를 사용함에 의해 달성될 수 있다. 추론적으로 IgG의 2개의 결합 부위간의 거리는 약 150-170Å으로서 CTLA-4의 활성 연결(2개의 CTLA-4 동종이량체간에 30 내지 50Å)에 대해서 너무 크다. 그러나, DVD-Ig(하나의 암)상의 2개의 결합 부위간의 거리는 30 내지 50Å의 범위로서 훨씬 짧고 CTLA-4의 적당한 연결을 허용한다.

[0285] 유사하게, DVD-Ig는 2개의 상이한 세포 표면 수용체 복합체의 구성원(예를 들어, IL12-R 알파 및 베타)을 표적화할 수 있다. 추가로, DVD-Ig는 CR1 및 가용성 단백질/병원체를 표적화하여 표적 가용성 단백질/병원체의 신속한 제거를 구동시킬 수 있다.

[0286] 또한, 본 발명의 DVD-Ig는 세포내 전달(내재화 수용체 및 세포내 분자를 표적화하는) 또는 뇌 내부로의 전달(혈뇌 장벽을 통과하기 위해 트랜스페린 수용체 및 CNS 질환 매개체를 표적화)을 포함하는, 조직-특이적 전달(국소 PK가 증진됨에 따라 효능을 보다 증진시키고/시키거나 독성을 저하시키기 위한 조직 마커 및 질환 매개체를 표적화함)을 위해 사용될 수 있다. DVD-Ig는 또한 항원의 비중화 에피토프에 결합함으로써 특정 위치로 항원을 전달하고 또한 항원의 반감기를 증가시키는 캐리어 단백질로서 작용할 수 있다. 또한, DVD-Ig는 환자에게 이식된 의료 장치에 물리적으로 연결되거나 이들 의료 장치를 표적화하도록 디자인될 수 있다(문헌참조: Burke, S. E. et al. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58(3), 437-446; Hildebrand, H. F. et al. (2006) Surface and Coatings Technol. 200(22-23): 6318-6324; Wu, P. et al. (2006) Biomaterials 27(11): 2450-2467; Marques, A. P. et al. (2005) Biodegrad. Syst. Tissue Eng. and Regen. Med. 377-397). 간략하게, 적당한 유형의 세포를 의학적 이식체 부위에 지시함으로써 정상적인 조직 기능을 치유하고 회복시킬 수 있다. 또한, 매개체(사이토킨을 포함하지만 이에 제한되지 않음)의 역제는 커플링된 DVD에 의한 장치 이식 즉시 또는 장치에 표적화되는 즉시 제공된다. 예를 들어, 스텐트는 차단된 동맥을 청소하고 심근으로의 혈류를 개선시키기 위해 개재 심장학에서 수년동안 사용되어 왔다. 그러나, 통상적인 노출된 금속 스텐트는 몇몇 환자에서 재발협착증(처리된 영역에서 동맥의 재협착)을 일으켜 혈액 응고를 유발할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 최근에, 항-CD34 항체 피복된 스텐트가 보고되었고 이는 혈액 전방에 걸쳐 순환하는 내피 전조 세포(EPC)를 포획함으로써 인해 발생하는 혈액 응고를 방지하고 재발협착증을 감소시킨다. 내피 세포는 혈관을 따라 존재하여 혈류를 원활하게 하는 세포이다. EPC는 스텐트의 경표면에 부착하여 연한 층을 형성하고 치유를 촉진시킬 뿐만 아니라 이전에 스텐트의 사용과 연관된 합병증인 재발협착증 및 혈액 응고를 방지한다 (Aoji et al. (2005) J. Am. Coll. Cardiol. 45(10):1574-9). 스텐트를 필요로 하는 환자에 대한 성과를 개선시킬 뿐만 아니라 심혈관 우회 수술을 필요로 하는 환자에도 관련이 있다. 예를 들어, 항-EPC 항체로 피복된 보죽 혈관(인공 동맥)은 우회 수술 이식을 위해 환자 다리 또는 팔로부터 동맥을 사용할 필요가 없다. 이것은 수술 및 마취 시간을 감소시키고 이어서 관상 수술 사망을 감소시킬 것이다. DVD-Ig는 세포 보강을 촉진시키는 이식된 장치상에 피복된 단백질(또는 지질 및 폴리사카라이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 종류의 에피토프) 뿐만 아니라 세포 표면 마커(CD34와 같은)에 결합되도록 하는 방식으로 디자인된다. 당해 방법은 또한 일반적으로 기타 의학적 이식체에 적용될 수 있다. 또한, DVD-Ig는 의료 장치에 피복될 수 있고 이식 및 장치로부터 모든 DVD가 방출되는 즉시(또는 이미 로딩된 DVD-Ig의 노화 및 변성을 포함하는 추가의 신선한 DVD-Ig를 필요로 할 수 있는 임의의 기타 요구시), 당해 장치는 신선한 DVD-Ig를 환자에게 전신 투여하여 재로딩될 수 있고 이때, DVD-Ig는 목적하는 표적(사이토킨, 세포 표면 마커(예를 들어, CD34)등)에 결합하도록 디자인되고 이는 장치상에 피복된 표적(지질, 폴리사카라이드 및 중합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 종류의 단백질, 에피토프를 포함함)에 대한 한 세트의 결합 부위와 다른 결합 부위를 갖는다. 당해 기술은 피복된 이식체의 유용성을 연장시키는 잇점을 갖는다.

[0287] **A. 다양한 질환에서 DVD-Ig의 용도**

[0288] 본 발명의 DVD-Ig 분자는 또한 다양한 질환을 치료하기 위한 치료학적 분자로서 유용하다. 당해 DVD 분자는 특정 질환에 관련된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 다양한 질환에서 당해 표적의 예는 하기된 바와 같다.

[0289] **1. 사람 자가면역 및 염증 반응**

[0290] 많은 단백질은 일반적인 자가면역 및 염증 반응에 연루되어 있고 다음을 포함한다: C5, CCL1 (I-309), CCL11 (에오타신), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 /에오타신-2), CCL25 (TECK),

CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1 (내피 단백질 합성화 사이토킨), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GF11, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB1R1, TGFB2R2, TGFB3R3, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, 및 RNF110 (ZNF144). 한 측면에서, 상기 열거된 하나 이상의 표적에 결합하는 DVD-Ig가 제공된다.

[0291] 염증 질환을 치료하기 위해 하기 표적 쌍에 결합할 수 있는 DVD Ig가 고려된다: TNF 및 IL-17A; TNF 및 RANKL; TNF 및 VEGF; TNF 및 SOST (서열 1); TNF 및 DKK; TNF 및 알파V베타3; TNF 및 NGF; TNF 및 IL-23p19; TNF 및 IL-6; TNF 및 SOST (서열 2); TNF 및 IL-6R; TNF 및 CD-20; IgE 및 IL-13 (서열 1); IL-13 (서열 1) 및 IL23p19; IgE 및 IL-4; IgE 및 IL-9 (서열 1); IgE 및 IL-9 (서열 2); IgE 및 IL-13 (서열 2); IL-13 (서열 1) 및 IL-9 (서열 1); IL-13 (서열 1) 및 IL-4; IL-13 (서열 1) 및 IL-9 (서열 2); IL-13 (서열 2) 및 IL-9 (서열 1); IL-13 (서열 2) 및 IL-4; IL-13 (서열 2) 및 IL-23p19; IL-13 (서열 2) 및 IL-9 (서열 2); IL-6R 및 VEGF; IL-6R 및 IL-17A; IL-6R 및 RANKL; IL-17A 및 IL-1베타 (서열 1); IL-1베타 (서열 1) 및 RANKL; IL-1베타 (서열 1) 및 VEGF; RANKL 및 CD-20; IL-1알파 및 IL-1베타 (서열 1); IL-1알파 및 IL-1베타 (서열 2); NKG2D와 CD-20; NKG2D와 CD-19(서열 1); NKG2D와 EGFR(서열 1); NKG2D와 EGFR(서열 2); NKG2D와 HER-2(서열 1); 및 NKG2D와 IGF1R(서열 1); 및 NKG2D와 EGFR(서열 3).

## [0292] 2. 천식

[0293] 알레르기성 천식은 상승된 혈청 IgE 수준 뿐만 아니라 호산구증가증, 배상세포 이형성증, 상피 세포 변화, 기도 과민반응 (AHR), 및 Th2 및 Th1 사이토킨 발현의 존재를 특징으로 한다. 현재 기도 염증이, T세포, B 세포, 호산구, 비만세포 및 대식세포의 복합 상호작용 및 사이토킨 및 케모킨을 포함하는 이들의 분비 매개체의 상호작용을 포함하는, 천식 병리학의 주요 인자인 것으로 광범위하게 수공되고 있다. 코르티코스테로이드는 오늘날 천식에 대해 가장 중요한 소염 치료제이지만 이의 작용 기작은 비특이적이고 특히 어린 환자 집단에서 안전성 문제가 존재한다. 따라서 보다 특이적이고 표적화된 치료제의 개발이 요구된다. 마우스에서 IL-13이, 호산구 염증과는 무관하게, AHR, 점액 과분비 및 기도 섬유증을 포함하는 천식의 많은 특징을 모방하고 있다는 증거가 증가하고 있다 (Finotto et al. (2005) Int. Immunol. 17(8): 993-1007; Padilla et al. (2005) J. Immunol. 174(12): 8097-8105).

[0294] IL-13은 천식과 연관된 병리학적 반응을 유발하는데 주요 역할을 가짐으로서 관련되어 있다. 폐에서 IL-13의 효과를 감소시키는 항-IL-13 모노클로날 항체 치료제 개발은 신규 천식 치료제의 개발을 위해 상당히 전망있는 흥미로운 신규 방법이다. 그러나, 상이한 면역학적 경로의 기타 매개체가 또한 천식 병리에 연루되어 있고 IL-13 뿐만 아니라 이들 매개체를 차단하는 것이 추가의 치료학적 이득들 제공할 수 있다. 당해 표적 쌍은 IL-13, 및 중앙 괴사 인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 프로-염증 사이토킨을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. TNF- $\alpha$ 는 천식에서 염증 반응을 증폭시킬 수 있고 질환 중증도와 관련될 수 있다 (McDonnell, et al. (2001) Progr. Respir. Res. 31: 247-250). 이것은 IL-13 및 TNF- $\alpha$  둘다의 차단이 특히, 심각한 기도 질환에서 이로운 효과를 가질 수 있음을 시사한다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 DVD-Ig는 표적 IL-13 및 TNF  $\alpha$ 에 결합하고 천식

을 치료하기 위해 사용된다.

[0295] 염증 및 AHR 둘다가 평가될 수 있는 OVA 유도된 천식 마우스 모델과 같은 동물 모델은 당업계에 공지되어 있고 천식을 치료하는 다양한 DVD-Ig의 능력을 측정하는데 사용될 수 있다. 천식을 연구하기 위한 동물 모델은 문헌 [참조: Coffman, et al.(2005) J. Exp. Med. 201(12): 1875-1879; Lloyd, et al. (2001) Adv. Immunol. 77: 263-295; Boyce et al. (2005) J. Exp. Med. 201(12): 1869-1873; 및 Snibson, et al. (2005) J. Brit. Soc. Allerg. Clin. Immunol. 35(2): 146-52]에 기재되어 있다. 당해 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가 뿐만 아니라, 면역억제 정도에 대한 특이적 시험이 요구될 수 있고 최상의 표적 쌍을 선별하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (1994) Toxicology 92(1-3): 229-43; Descotes, et al. (1992) Devel. Biol. Stand. 77: 99-102; Hart et al. (2001) J. Allerg. Clin. Immunol. 108(2): 250-257).

[0296] 상기된 추론 및 효능 및 안정성에 대한 동일한 평가 모델을 사용함을 기초로, DVD-Ig 분자가 결합할 수 있고 천식을 치료하는데 유용한 기타 표적 쌍을 측정할 수 있다. 하나의 양태에서, 당해 표적은 IL-13과 IL-1베타(IL-1베타는 또한 천식에서 염증 반응에 연루되어 있다); IL-13과 염증에 관여하는 사이토킨과 케모킨, 예를 들어 IL-13과 IL-9; IL-13과 IL-4; IL-13과 IL-5; IL-13과 IL-25; IL-13과 TARC; IL-13과 MDC; IL-13과 MIF; IL-13과 TGF- $\beta$ ; IL-13과 LHR 효능제; IL-13과 CL25; IL-13과 SPRR2a; IL-13과 SPRR2b; 및 IL-13과 ADAM8을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명은 또한 하기의 그룹으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 천식에 연루된 하나 이상의 표적과 결합할 수 있는 DVD-Ig를 제공한다: CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$ 1, IFN $\gamma$ , 히스타민 및 히스타민 수용체, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, 및 키티나제.

### [0297] 3. 류마티스 관절염

[0298] 전신성 질환인 류마티스 관절염(RA)는 관절 활막에서의 만성 염증 반응을 특징으로 하고 연골의 퇴화 및 관절 인접 골의 부식과 연관되어 있다. TNF, 케모킨 및 성장 인자를 포함하는 많은 염증 촉진 사이토킨은 환부 관절에서 발현된다. RA의 마우스 모델에 항-TNF 항체 또는 sTNFR 융합 단백질 융합 단백질의 전신성 투여는 소염 및 관절 보호성 인것으로 나타났다. RA 환자에서 TNF의 활성이 정맥내 투여되는 인플릭시마브에 차단된 임상적 연구 (Harriman, G. et al.(1999) Ann. Rheum. Dis. 58 (Suppl 1):I61-4.)에서, 키메라 항-TNF 모노클로날 항체(mAB)는 TNF가 IL-6, IL-8, MCP-1 및 VEGF의 생산, 면역 및 염증 세포의 관절로의 보강, 혈관형성 및 매트릭스 메탈로프로테이나제-1 및 3의 혈액 수준의 감소를 조절한다는 증거를 제공했다. 류마티스 관절염에서 염증 경로의 보다 나은 이해를 통해 류마티스 관절염에 연루된 기타 치료학적 표적을 동정하게 되었다. 인터류킨-6 길항제, Chugai, Roche에 의해 개발된 IL-6 수용체 항체 MRA(문헌참조: Nishimoto, N. et al. (2004) Arthrit. Rheum. 50(6): 1761-1769), CTLA4Ig (abatacept, Genovese, M. et al. (2005) N. Engl. J. Med. 353:1114-23.), 및 항-B 세포 치료 (rituximab; Okamoto, H. and Kamatani, N. (2004) N. Engl. J. Med. 351:1909)와 같은 전망있는 치료제가 지난해에 걸쳐 무작위 조절된 시험에서 이미 시험되었다. 인터류킨-15(치료학적 항체 HuMax-IL15, AMG714, 문헌참조: Baslund, B. et al. (2005) Arthrit. Rheum. 52(9): 2686-2692), 인터류킨-17 및 인터류킨-18을 포함하는 기타 사이토킨이 동정되었고 동물 모델에서 이로온 것으로 나타났고 이들 제제의 임상적 시험이 진행중에 있다. 항-TNF와 또 다른 매개체를 병용하는 이원 특이적 항체 치료는 임상적 효능 및/또는 환자 보호에 큰 잠재력을 갖는다. 예를 들어, TNF 및 VEGF 둘다를 차단함으로써 RA의 병생리학에 연루된 염증 및 혈관형성을 잠재적으로 박멸시킬 수 있다. TNF와 IL-18; TNF와 IL-12; TNF와 IL-23; TNF와 IL-1베타; TNF와 MIF; TNF와 IL-17; TNF와 IL-15; TNF와 SOST를 포함하지만 이에 제한되지 않는 RA에 연루된 기타 표적쌍을 특이적 DVD Ig로 차단시키는 것이 또한 고려된다. 이들 표적 쌍에 대한 통상적인 안정성 평가 뿐만 아니라 면역 억제 정도에 대한 특정 시험이 요구될 수 있고 표적 쌍을 선별하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (1994) Toxicol. 92(1-3): 229-43; Descotes, et al. (1992) Devel. Biol. Stand. 77: 99-102; Hart et al. (2001) J. Allerg. Clin. Immunol. 108(2): 250-257). DVD Ig 분자가 류마티스 관절염 치료를 위해 유용할 것인지의 여부는 콜라겐 유도된 관절염 마우스 모델과 같은 임상전 동물 RA 모델을 사용하여 평가할 수 있다. 기타 유용한 모델은 또한 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: Brand D. D. (2005) Comp. Med. 55(2):114-22). 사람 및 마우스 유사체에 대한 모 항체의 교차 반응성을 기준으로(예를 들어, 사람 및 마우스 TNF, 사람 및 마우스 IL-15 등에 대한 반응성), 마우스 CIA 모델에서 입증 연구는 "일치된 대응 항체" 유래된

DVD-Ig 분자로 수행될 수 있고; 간략하게 2개(또는 그 이상)의 마우스 표적 특이적 항체를 기초로 하는 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제에 대해 사용된 모 사람 또는 사람화된 항체의 특성(유사 친화성, 유사 중화 효능, 유사 반감기 등)에 가능한한 정도로 일치될 수 있다

[0299] **4. SLE**

[0300] SLE의 면역병리학적 특징은 폴리클로날 B 세포가 활성화되어 글로불린 과다 혈증, 자가항체 생산 및 면역 복합체의 형성이 유도된다는 것이다. 기본적인 비정상적 현상은 T 세포가, 일반화된 T 세포 조절불능으로 인해 막아야 될 B 세포 클론을 억제하지 못한다는 것이다. 또한, B 및 T-세포 상호작용은, 제2 시그널을 개시하는 CD40과 CD40L, B7과 CD28 및 CTLA-4와 같은 공동 자극 분자 뿐만 아니라 여러 사이토킨(예를 들어, IL-10)에 의해 촉진된다. 이들 상호작용은, 면역 복합체 및 아폽토시스 물질에 대한 식세포 제거의 손상과 함께 면역 반응을 존속시키고 조직 손상이 유발된다. 하기의 표적이 SLE에 연루될 수 있고 잠재적으로 치료학적 중재를 위한 DVD-Ig 방법(B 세포 표적 치료)을 위해 잠재적으로 사용될 수 있다: CD-20, CD-22, CD-19, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA, BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, 및 NT5E.; 공동 자극 시그널: CTLA4 또는 B7.1/B7.2; B 세포 생존 억제: BlyS 또는 BAFF; 보체 불활성화: C5; 사이토킨 조절. 주요 원리는 임의의 조직에서 총 생물학적 반응이 염증 촉진 또는 소염 사이토킨의 국소적 수준간에 이의 균형에 따른 결과인 것이다(문헌참조: Sfrikakis P. P. et al. (2005) Curr. Opin. Rheumatol. 17:550-7). SLE는 혈청중에서 IL-4, IL-6, IL-10이 상승하는 것으로 입증된 Th-2 유발 질환인 것으로 간주된다. IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$ , 및 TNF- $\alpha$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 표적에 결합하는 DVD-Ig가 또한 고려된다. 상기 논의된 표적의 조합은 SLE에 대한 치료학적 효능을 증진시킬 것이고 이것은 다수의 낭창 임상전 모델에서 시험될 수 있다(문헌참조: Peng S. L. (2004) Methods Mol. Med. 102:227-72). 사람에 대한 모 항체 및 마우스 유사체의 교차 반응성을 기준으로(예를 들어, 사람 및 마우스 CD20, 사람 및 마우스 인터페론 알파 등에 대한 반응성), 마우스 낭창 모델에서 "일치된 대응 항체" 유래된 DVD-Ig 분자를 사용하여 확인 연구를 수행할 수 있다. 간략하게 DVD-Ig 기반 2개(이상)의 마우스 표적 특이적 항체는 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용되는 모 사람 또는 사람화된 항체의 특성(유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)을 분석할 수 있을 정도로 일치할 수 있다).

[0301] **5. 다발성 경화증**

[0302] 다발성 경화증 (MS)은 병인이 명백하게 미지인 복합 사람 자가면역형 질환이다. 신경계 전반에 걸친 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 면역학적 파괴는 다발성 경화증의 주요 병리이다. MS는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 의한 침투를 포함하는 복합 병리 질환이고 중추 신경계내 반응 질환이다. 사이토킨, 반응성 질소 중 및 동시자극인자 분자의 CNS내 발현은 모두 MS에서 기재되었다. 주로 고려되는 것은 자가면역 발병에 기여하는 면역학적 기작이다. 특히, 항원 발현, 사이토킨 및 백혈구 상호작용 및 조절 T-세포는 Th1 및 Th2 세포와 같은 기타 T-세포의 균형/조절을 도와주고 치료학적 표적 동정을 위해 중요한 영역이다.

[0303] IL-12는 염증 촉진 사이토킨이고 APC에 의해 생성되어 Th1 이펙터 세포의 분화를 촉진한다. IL-12는 MS를 앓는 환자 및 EAE-에 걸린 동물의 발생 병변에서 생성된다. 이전에, IL-12 경로에서의 간섭은 설치류에서 EAE를 예방하고 항-IL-12 mAb를 사용한 IL-12p40의 생체내 중화는 통상의 마모셋에서 미엘린 유도된 EAE 모델에서 이로온 효과를 갖는 다는 것을 보여주었다.

[0304] TWEAK는 TNF 계열의 구성원이고, 염증 촉진, 증식 또는 아폽토시스 효과가 세포 유형에 의존하는 중추 신경계(CNS)내에서 항상성으로 발현된다. 이의 수용체인 Fn14는 내피 세포, 반응성 성상세포 및 뉴런에 의해 CNS에서 발현된다. TWEAK 및 Fn14 mRNA 발현은 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 동안에 척수에서 증가된다. C57BL/6 마우스에서 미엘린 올리고수지상세포 당단백질(MOG) 유도된 EAA에서 항-TWEAK 항체 처리는 마우스가 적응(priming) 기간 후 처리되는 경우 질환 중증도 및 백혈구 침투를 감소시킨다.

[0305] 본 발명의 한 측면은 IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFN $\gamma$ , GM-CSF, FGF, C5, CD52, 및 CCR2로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상, 예를 들어, 2개의 표적과 결합할 수 있는 DVD Ig 분자에 관한 것이다. 하나의 양태는 MS의 치료에 이로온 치료제로서 이원-특이적 항-IL-12/TWEAK DVD Ig를 포함한다.

[0306] MS를 치료하기 위한 DVD 분자의 유용성을 평가하기 위한 여러 동물 모델은 당업계에 공지되어 있다 (문헌참조: Steinman, L. et al. (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin, F. D. et al. (1985) Springer Semin Immunopathol. 8(3):197-208; Genain, C.P. et al. (1997) J. Mol. Med. 75(3):187-97; Tuohy, V. K. et al. (1999) J. Exp. Med. 189(7):1033-42; Owens, T. et al. (1995) Neurol. Clin. 13(1):51-73; 및 Hart, B. A. et al. (2005) J. Immunol. 175(7):4761-8). 사람 및 동물 중 유사체에 대한 모 항체의 교차 반응성(예를 들어, 사람 및 마우스 IL-12, 사람 및 마우스 TWEAK 등에 대한 반응성)을 기준으로 "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig 분자를 사용하여 마우스 EAE 모델에서 확인 연구를 수행할 수 있다. 간략하게, 2개(또는 그 이상)의 마우스 표적 특이적 항체에 대한 것을 기초로 하는 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용되는 모 사람 또는 사람화된 항체의 특성 (유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)을 분석할 수 있는 정도 일치될 수 있다. 동일한 개념을 기타 비-설치류 종의 동물 모델에 적용하고, 여기서, "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig는 예상된 약리학 및 가능한 안정성 연구를 위해 선별된다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가 뿐만 아니라 면역 억제 정도에 대한 특정 시험이 요구될 수 있고 최상의 표적 쌍을 선택하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al. (1994) Toxicol. 92(1-3): 229-43; Descotes, et al. (1992) Devel. Biol. Stand. 77: 99-102; Jones, R. (2000) IDrugs 3(4): 442-6).

## [0307] 6. 패혈증

[0308] 패혈증의 병생리학은 그람 음성 유기체의 외막 성분(리포폴리사카라이드[LPS], 지질 A, 내독소) 및 그람 양성 유기체의 외막 성분(리포테이코산, 펩티도글리칸)에 의해 개시된다. 이들 외막 성분은 단핵구의 표면상의 CD14 수용체와 결합할 수 있다. 이어서 최근에 보고된 톨(toll)형 수용체에 의해, 시그날은 세포로 전달되어 결국 염증 촉진 사이토킨 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파) 및 인터류킨-1(IL-1)의 생성을 유발한다. 압도적인 염증 및 면역 반응은 패혈성 쇼크의 필수적 특징이고 조직 손상, 다발성 기관 부전증 및 패혈증 유도된 사멸의 병리에 중추 역할을 한다. 사이토킨, 특히, 종양 괴사 인자 (TNF) 및 인터류킨 (IL)-1은 패혈성 쇼크의 중요한 매개체인 것으로 밝혀졌다. 이들 사이토킨은 조직에 대한 직접적인 독성 효과를 갖고 이들은 또한 포스포리파제 A2를 활성화시킨다. 이들 및 기타 효과는 혈소판 활성화 인자의 농도를 증가시키고 산화질소 신타제 활성을 촉진시키고 호중구에 의한 조직 침투를 촉진시키고 호중구 활성을 촉진시킨다.

[0309] 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료는 임상적 난제로서 남아있고 염증 반응에 겨냥된 생물학적 반응 개질제(즉, 항-TNF 및 항-MIF)를 사용한 최근 기대되는 시험이 단지 약간의 임상적 이득을 나타내었다. 최근에, 관심이 면역 억제제의 수반된 기간을 역전시키기를 목표로 하는 치료쪽으로 전환되었다. 실험 동물 및 중증 환자에 대한 연구는 림프성 기관 및 몇몇 유조직의 증가된 아포토시스가 당해 면역 억제, 아네르기 및 기관계 기능부전에 기여하는 것임을 입증하였다. 패혈증 중후군동안에, 림프구 아포토시스는 IL-12의 부재 또는 글루코코르티코이드, 그랜자임 또는 소위 '사멸' 사이토킨, 종양 괴사 인자 알파 또는 Fas 리간드의 방출에 의해 유발될 수 있다. 아포토시스는 시토졸 및/또는 미토콘드리아 카스파제의 자가 활성화를 통해 진행하고, 당해 카스파제는 Bcl-2 계열의 아포토시스 촉진 및 항-아포토시스 구성원에 의해 영향받을 수 있다. 실험적 동물에서, 아포토시스의 억제제를 사용한 치료로 림프구 세포 아포토시스를 방지할 수 있을 뿐만 아니라 이것은 또한 당해 결과를 개선시킬 수 있다. 항-아포토시스 제제를 사용한 임상적 시도는 대부분 이들의 투여 및 조직 표적화와 연관된 기술적 어려움으로 인해 아득하지만 림프구 아포토시스의 억제는 패혈성 환자에 대한 매력적인 치료학적 표적을 나타낸다. 또한, 염증 매개체 및 아포토시스 매개체를 표적화하는 이원 특이적 제제는 부가 이득을 가질 수 있다. 본 발명의 한 측면은 하기의 표적으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 패혈증에 연루된 하나 이상의 표적, 바람직하게는 2개의 표적과 결합할 수 있는 DVD Ig에 관한 것이다: TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, 톨형 수용체, TLR-4, 조직 인자, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1B, NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF, NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, 미드킨, IRAK1, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, 및 TREM1. 패혈증에 대한 당해 DVD Ig의 효능은 당업계에 공지된 임상전 동물 모델에서 평가될 수 있다(문헌참조: Buras, J. A., et al., (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4(10):854-65 and Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2):164-70).

## [0310] 7. 신경학적 장애

### [0311] 7.1. 신경퇴행성 질환

[0312] 신경퇴행성 질환은 일반적으로 연령에 의존하는 만성이거나 급성(예를 들어, 중증, 외상후 뇌 손상, 척수 손상 등)이다. 이들은 신경 기능의 점진적인 상실(뉴런 세포사, 탈수초화), 운동성 상실 및 기억 상실을 특징으로 한다. 이들은 뉴런 기능의 점진적인 상실(뉴런 세포 사멸, 탈수초화), 운동성 상실 및 기억 상실을 특징으로 한

다. 만성 신경퇴행성 질환(예를 들어, 알츠하이머 질환)을 뒷받침하는 기작에 대한 새로운 지식은 복합적 병인을 보여주고 다양한 인자, 예를 들어, 혈당 상태, 아밀로이드 생산 및 다량체화, 수용체 RAGE(AGE에 대한 수용체)에 결합하는 진전된 당화 최종 생성물(AGE)의 축적, 증가된 뇌 산화 스트레스, 감소된 뇌 혈류, 염증성 사이토킨 및 케모킨을 포함하는 신경염증, 뉴런 기능부전 및 소교 세포 활성화가 이들의 발병 및 진행에 기여하는 것으로 인지되었다. 따라서, 이들 만성 신경퇴행성 질환은 다발성 세포 유형 및 매개체간에 복잡한 상호작용을 나타낸다. 당해 질환에 대한 치료 전략은 제한되고 대부분 비특이적 소염제(예를 들어, 코르티코스테로이드, COX 억제제)로 염증 과정을 차단하거나 당해 제제로 뉴런 상실 및/또는 시냅스 기능을 차단하는 것으로 구성된다. 이들 치료는 질환 진행을 중지시키는데 실패한다. 최근 연구는 가용성 A- $\beta$  펩타이드(A- $\beta$  올리고머 형태를 포함함)에 대한 항체와 같은 보다 표적화된 치료가 질환 진행의 중지를 도와줄 수 있을 뿐만 아니라 기억의 유지를 도와줄 수 있음을 시사한다. 이들 예비 관찰은 하나 이상의 질환 매개체(예를 들어, A- $\beta$ , 및 TNF와 같은 염증 촉진 사이토킨)를 표적화하는 특정 치료가 단일 질환 기작(예를 들어, 가용성 A- $\beta$  단독)을 표적화하여 관찰되는 것 보다 만성 신경퇴행성 질환에 대해 보다 우수한 치료학적 효능을 제공할 수 있음을 시사한다. MS를 치료하기 위한 DVD 분자의 유용성을 평가하기 위한 여러 동물 모델은 당업계에서 공지되어 있다 (문헌참조: Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin F.D. et al., (1985) Springer Semin. Immunopathol. 8(3):197-208; Genain C.P. et al. (1997) J. Mol. Med. 75(3):187-97; Tuohy V.K. et al. (1999) J. Exp. Med. 189(7):1033-42; Owens, T. et al. (1995) Neurol. Clin. 13(1):51-73; 및 Hart, B.A. et al. (2005) J. Immunol. 175(7):4761-8). 사람 및 동물 중 유사체에 대한 모 항체의 교차 반응성(예를 들어, 사람 및 마우스 IL-12, 사람 및 마우스 TWEAK 등에 대한 반응성)을 기준으로 "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig 분자를 사용하여 마우스 EAE 모델에서 확인 연구를 수행할 수 있다. 간략하게 마우스 표적 특이적 항체에 대한 것을 기초로 하는 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용되는 모 사람 또는 사람화된 항체의 특성 (유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)을 분석할 수 있는 정도 일치될 수 있다. 동일한 개념을 기타 비-설치류 종의 동물 모델에 적용하고, 여기서, "일치된 대응 항체" 유래 DVD-Ig는 예상된 약리학 및 가능한 안전성 연구를 위해 선별된다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가 뿐만 아니라 면역 억제 정도에 대한 특정 시험이 요구될 수 있고 최상의 표적 쌍을 선택하는데 도움이 된다(문헌참조: Luster et al.(1994) Toxicol. 92(1-3):229-43; Descotes et al. (1992) Devel. Biol. Stand. 77:99-102; Jones, R. (2000) IDrugs 3(4):442-6).

[0313] 본 발명의 DVD-Ig 분자는 알츠하이머와 같은 만성 신경퇴행성 질환에 연루된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 당해 표적은 AD 병리학에 연루된 임의의 매개체, 가용성 또는 세포 표면, 예를 들어, AGE(S100A, 암포테린), 염증 촉진 사이토킨(예를 들어, IL-1), 케모킨(예를 들어, MCP 1), 신경 재생을 억제하는 분자(예를 들어, Nogo, RGM A), 신경 성장을 증진시키는 분자(뉴로트로핀) 및 혈뇌장벽에서 수송을 매개할 수 있는 분자(예를 들어, 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체 또는 RAGE)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. DVD-Ig 분자의 효능은 아밀로이드 전구체 단백질 또는 RAGE를 과발현하고 알츠하이머 질환 유사 증상을 나타내는 유전자 전이 마우스와 같은 임상전 동물 모델에서 유효할 수 있다. 또한, DVD-Ig 분자는 작제되고 동물 모델에서 효능에 대해 시험될 수 있고 사람 환자에서 시험하기 위한 최상의 치료학적 DVD-Ig 가 선택될 수 있다. DVD-Ig 분자는 또한 파킨슨 질환과 같은 기타 신경퇴행성 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다. 알파-시누클레인은 파킨슨 병리학에 관여한다. 알파-시누클레인 및 염증 매개체(예를 들어, TNF, IL-1, MCP-1)를 표적화할 수 있는 DVD-Ig는 파킨슨 질환에 대해 효과적인 치료임을 입증할 수 있고 본 발명에 고려된다.

## [0314] 7.2 신경 소생 및 척수 손상

[0315] 병리학적 기작의 지식이 증가했음에도 불구하고 척수 손상(SCI)은 여전히 황무지인 상태이고 고도의 의학적 요구를 특징으로 하는 의학적 징후를 나타낸다. 대부분의 척수는 타박상이거나 압착 손상이고 1차 손상은 일반적으로 2차 손상 기작(염증 매개체, 예를 들어, 사이토킨 및 케모킨)에 따른 것이고 이것은 초기 손상을 악화시키고 환부를, 때때로 10배 이상으로 증대시킨다. SCI에서 이들 1차 및 2차 기작은 기타 수단에 의해 유발되는 뇌 손상, 예를 들어, 뇌졸중의 기작과 매우 유사하다. 어떠한 만족할만한 치료가 존재하지 않고 메틸프레드니솔론(MP)의 고 투여량의 일시 주사가 손상 후 8시간의 좁은 시간 범위에서만 사용되는 치료이다. 그러나, 당해 치료는 단지 임의의 상당한 기능적 회복 없이 2차 손상을 예방하기 위해 의도된다. 명백한 효능의 부재 및 후속 감염 및 중증 조직학적 근육 변형을 갖는 면역억제와 같이 중증 역효과 때문에 가혹하게 비판받고 있다. 내인성 소행 잠재력을 자극하는 어떠한 다른 약물, 생물학적 또는 소분자도 승인되지 않았지만 최근해에 SCI의 동물 모델에서 전망있는 치료 원리 및 약물 후보가 효능을 나타내었다. 사람 SCI에서 기능적 회복의 부재는 대부분, 환부, 상처 조직, 미엘린에서 및 손상 관련 세포상에서 신경돌기 성장을 억제하는 인자에 의해 유발된다. 당해 인자는 미엘린 연관 단백질 NogoA, OMgp 및 MAG, RGM A, 상처 연관 CSPG(콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸)

및 반응성 성장세포에 대한 억제 인자(몇몇 세마포린 및 에프린)이다. 그러나, 환부에는 성장 억제 인자 뿐만 아니라 뉴로트로핀, 라미닌, L1 및 기타와 같은 신경돌기 성장 자극 인자가 존재한다. 신경돌기 성장 억제 및 성장 촉진 분자의 전체적 효과는 NogoA 또는 RGM A와 같은 단일 인자의 차단이, 억제 영향의 감소가 성장 억제로부터 성장 촉진으로의 균형을 전환시킬 수 있기 때문에, 설치류 SCI 모델에서 기능적으로 상당히 회복시킴을 설명할 수 있다. 그러나, 단일 신경돌기 과증식 억제 분자를 차단함으로써 관찰되는 회복은 완전하지 않다. 보다 신속하고 보다 명백한 회복을 달성하기 위해, Nogo 및 RGM A와 같은 2개의 신경돌기 과증식 억제 분자를 차단하거나 신경돌기 과증식 억제 분자를 차단하고 신경돌기 과증식 증진 분자(예를 들어, Nogo 및 뉴로트로핀)의 기능을 증진시키거나 신경돌기 과증식 억제 분자(Nogo 및 염증 촉진 분자, 예를 들어, TNF)를 차단하는 것이 바람직할 수 있다 (문헌참조: McGee, A. W. et al. (2003) Trends Neurosci. 2003;26:193; Domeniconi, M. et al. (2005) J. Neurol. Sci. 233:43; Makwanal, M. et al. (2005) FEBS J. 272:2628; Dickson, B. J. (2002) Science. 298:1959; Yu, F. and Teng, H. et al. (2005) J. Neurosci. Res. 79:273; Karnezis, T. et al. (2004) Nature Neurosci. 7: 736; Xu, G. et al. (2004) J. Neurochem. 91: 1018).

[0316]

한 측면에서, NgR과 RGM A; NogoA와 RGM A; MAG과 RGM A; OMgp와 RGM A; RGM A와 RGM B; CSPG와 RGM A; 아그레칸, 미드킨, 뉴로칸, 베르시칸, 포스파칸, Te38 및 TNF- $\alpha$ ; A $\beta$  원형체 특이적 항체와 같은 표적 쌍과 결합할 수 있는 DVD-Ig가 수지상세포 & 액손 발아를 촉진하는 항체와 배합되어 제공된다. 수지상세포 병리는 AD에 대한 매우 초기 징후이고 NOGO A가 수지상세포 성장을 제한시키는 것으로 공지되어 있다. 당업자는 당해 유형의 하나의 Ab를 SCI-후보물(미엘린-단백질) Ab들과 배합할 수 있다. 기타 DVD-Ig 표적은 NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG 및 Omgp의 조합체를 포함할 수 있다. 추가로, 표적은 또한 신경돌기의 억제에 연루된 임의의 매개체, 가용성 또는 세포 표면, 예를 들어, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, 세마포린, 에프린, 가용성 A-b, 염증 촉진 사이토킨(예를 들어, IL-1), 케모킨(예를 들어, MIP 1a), 신경 소행을 억제하는 분자를 포함할 수 있다. 항-Nogo/항-RGM A 또는 유사한 DVD-Ig 분자의 효능은 척수 손상의 임상 전 동물 모델에서 유효할 수 있다. 또한, 이들 DVD-Ig 분자가 작제될 수 있고 동물 모델에서 효능에 대해 시험될 수 있고 최상의 치료학적 DVD-Ig가 사람 환자에서 시험하기 위해 선택될 수 있다. 또한, 단일 수용체, 예를 들어, 3개의 리간드 Nogo, Ompg 및 MAG와 결합하는 Nogo 수용체 및 A-b 및 S100 A와 결합하는 RAGE상에 2개의 별도의 결합 부위를 표적화하는 DVD-Ig 분자가 작제될 수 있다. 추가로, 신경돌기 과증식 억제제, 예를 들어, nogo 및 nogo 수용체는 또한 다발성 경화증과 같은 면역학적 질환에서 신경 소생을 방지하는 역할을 한다. nogo-nogo 수용체 상호작용의 억제는 다발성 경화증의 동물 모델에서 회복을 증진시키는 것으로 나타났다. 따라서, 하나의 면역 매개체, 예를 들어, IL-12와 같은 사이토킨의 기능 및 신경돌기 과증식 억제제 분자, 예를 들어, nogo 또는 RGM의 기능을 차단할 수 있는 DVD-Ig 분자는 면역 또는 신경돌기 억제제 분자만을 차단하는 것 보다 신속하고 보다 큰 효능을 제공할 수 있다.

[0317]

일반적으로, 항체는 효율적이고 적절한 방식으로 혈뇌 장벽(BBB)을 통과하지 못한다. 그러나, 특정 신경학적 질환에서, 예를 들어, 졸중, 외상 뇌 손상, 다발성 경화증 등에서 BBB는 손상될 수 있고 DVD-Ig 및 항체의 뇌로의 침투를 증가시킬 수 있다. 예를 들어 BBB 누출이 발생하지 않은 다른 신경학적 병태에서는 예를 들어, BBB의 혈관 내피에서 글루코스 및 아미노산 캐리어 및 수용체 매개된 트랜스사이토시스 매개 세포 구조물/수용체를 포함하는 캐리어 매개된 수송체의 표적화를 사용함에 따라 DVD-Ig의 BBB를 통과하는 수송을 가능하게 할 수 있다. 당해 수송을 가능하게 하는 BBB에서의 구조물은 인슐린 수용체, 트랜스페린 수용체, LRP 및 RAGE를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 전략은 저분자량의 약물, 나노입자 및 핵산을 포함하는 효능있는 약물을 CNS로 수송하기 위한 셔틀로서 DVD-Ig를 사용할 수 있게 한다(문헌참조: Coloma, M. J. et al. (2000) Pharm Res. 17(3):266-74; Boado, R. J. et al. (2007) Bioconjug. Chem. 18(2):447-55).

[0318]

## 8. 종양학적 장애

[0319]

모노클로날 항체 치료는 암에 대한 중요한 치료학적 방식으로 나타났다 (von Mehren M, et al. (2003) Annu. Rev. Med.54:343-69). 항체는 아포토시스, 제지시킨 세포독성, 리간드-수용체 상호작용의 간섭을 유도하거나 신생물 표현형에 중요한 단백질의 발현을 차단함에 의해 항종양 효과를 발휘할 수 있다. 또한, 항체는 종양 미세환경의 성분을 표적화하여 종양 연관 혈관형성과 같은 중요한 구조물을 교란시킬 수 있다. 항체는 또한 리간드가 성장 인자인 수용체, 예를 들어, 상피 성장 인자 수용체를 표적화할 수 있다. 따라서, 당해 항체는 표적화된 종양 세포에 결합하여 세포 성장을 자극하는 중성 리간드를 억제한다. 또한, 항체는 항-이디오타입 네트워크. 보체 매개 세포독성 또는 항체 의존성 세포성 세포 독성(ADCC)를 유도할 수 있다. 2개의 별도의 종양 매개체를 표적화하는 이원-특이적 항체의 사용은 단일 특이적 치료에 비하여 추가의 이득을 제공한다. 종양학적 질환을 치료하기 위하여 다음의 표적 쌍에 결합할 수 있는 DVD Ig가 또한 고려된다: IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및

HER-2; VEGFR 및 EGFR; CD20 및 CD3; CD138 및 CD20; CD38 및 CD20; CD38 및 CD138; CD40 및 CD20; CD138 및 CD40; CD38 및 CD40; CD-20 및 CD-19; CD-20 및 EGFR; CD-20 및 CD-80; CD-20 및 CD-22; CD-3 및 HER-2; CD-3 및 CD-19; EGFR 및 HER-2; EGFR 및 CD-3; EGFR 및 IGF1,2; EGFR 및 IGF1R; EGFR 및 RON; EGFR 및 HGF; EGFR 및 c-MET; HER-2 및 IGF1,2; HER-2 및 IGF1R; RON 및 HGF; VEGF 및 EGFR; VEGF 및 HER-2; VEGF 및 CD-20; VEGF 및 IGF1,2; VEGF 및 DLL4; VEGF 및 HGF; VEGF 및 RON; VEGF 및 NRP1; CD20 및 CD3; VEGF 및 PLGF; DLL4 및 PLGF; ErbB3 및 EGFR; HGF 및 ErbB3, HER-2 및 ErbB3; c-Met 및 ErbB3; HER-2 및 PLGF; HER-2 및 HER-2; NKG2D 및 CD-20; NKG2D 및 CD-19(서열 1); NKG2D 및 EGFR(서열 1); NKG2D 및 HER-2; NKG2D 및 IGF1R(서열 1); 및 NKG2D 및EGFR(서열 3).

[0320]

또 다른 양태에서, 본 발명의 DVD는 다음과 결합할 수 있다: VEGF 및 포스파티딜세린; VEGF 및 ErbB3; VEGF 및 PLGF; VEGF 및 ROBO4; VEGF 및 BSG2; VEGF 및 CDCP1 ; VEGF 및 ANPEP; VEGF 및 c-MET; HER-2 및 ERB3; HER-2 및 BSG2; HER-2 및 CDCP1 ; HER-2 및 ANPEP; EGFR 및 CD64; EGFR 및 BSG2; EGFR 및 CDCP1 ; EGFR 및 ANPEP; IGF1R 및 PDGFR; IGF1R 및 VEGF; IGF1R 및 CD20; CD20 및 CD74; CD20 및 CD30; CD20 및 DR4; CD20 및 VEGFR2; CD20 및 CD52; CD20 및 CD4; HGF 및 c-MET; HGF 및 NRP1; HGF 및 포스파티딜세린; ErbB3 및 IGF1R; ErbB3 및 IGF 1,2; c-Met 및 Her-2; c-Met 및 NRP1 ; c-Met 및 IGF1R; IGF 1,2 및 PDGFR; IGF 1,2 및 CD20; IGF 1,2 및 IGF1R; IGF2 및 EGFR; IGF2 및 HER2; IGF2 및 CD20; IGF2 및 VEGF; IGF2 및 IGF1R; IGF1 및 IGF2; PDGFRa 및 VEGFR2; PDGFRa 및 PLGF; PDGFRa 및 VEGF; PDGFRa 및 c-Met; PDGFRa 및 EGFR; PDGFRb 및 VEGFR2; PDGFRb 및 c-Met; PDGFRb 및 EGFR; RON 및 c-Met; RON 및 MTSPI ; RON 및 MSP; RON 및 CDCP1 ; VGFR1 및 PLGF; VGFR1 및 RON; VGFR1 및 EGFR; VEGFR2 및 PLGF; VEGFR2 및 NRP1 ; VEGFR2 및 RON; VEGFR2 및 DLL4; VEGFR2 및 EGFR; VEGFR2 및 ROBO4; VEGFR2 및 CD55; LPA 및 S1P; EPHB2 및 RON; CTLA4 및 VEGF; CD3 및 EPCAM; CD40 및 IL6; CD40 및 IGF; CD40 및 CD56; CD40 및 CD70; CD40 및 VEGFR1; CD40 및 DR5; CD40 및 DR4; CD40 및 APRIL; CD40 및 BCMA; CD40 및 RANKL; CD28 및 MAPG; CD80 및 CD40; CD80 및 CD30; CD80 및 CD33; CD80 및 CD74; CD80 및 CD2; CD80 및 CD3; CD80 및 CD19; CD80 및 CD4; CD80 및 CD52; CD80 및 VEGF; CD80 및 DR5; CD80 및 VEGFR2; CD22 및 CD20; CD22 및 CD80; CD22 및 CD40; CD22 및 CD23; CD22 및 CD33; CD22 및 CD74; CD22 및 CD19; CD22 및 DR5; CD22 및 DR4; CD22 및 VEGF; CD22 및 CD52; CD30 및 CD20; CD30 및 CD22; CD30 및 CD23; CD30 및 CD40; CD30 및 VEGF; CD30 및 CD74; CD30 및 CD19; CD30 및 DR5; CD30 및 DR4; CD30 및 VEGFR2; CD30 및 CD52; CD30 및 CD4; CD138 및 RANKL; CD33 및 FTL3; CD33 및 VEGF; CD33 및 VEGFR2; CD33 및 CD44; CD33 및 DR4; CD33 및 DR5; DR4 및 CD137; DR4 및 IGF1,2; DR4 및 IGF1R; DR4 및 DR5; DR5 및 CD40; DR5 및 CD137; DR5 및 CD20; DR5 및 EGFR; DR5 및 IGF1,2; DR5 및 IGF1R, DR5 및 HER-2, 및 EGFR 및 DLL4. 기타 표적 조합은 EGF/erb-2/erb-3 계열의 하나 이상의 구성원을 포함한다. DVD-Ig가 결합할 수 있는 종양약적 질환에 관여하는 기타 표적(하나 이상)은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL 12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1R, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB11, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NROB1, NROB2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB11, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF,

PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNFAIP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFN2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, CCL2, CDH5, COL1 8A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1 (E-카드헤린), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16INK4a), COL6A1, CTNBN1 (b-카테닌), CTSB (카텝신 B), ERBB2 (Her-2), ESR1, ESR2, F3 (TF), FOSL1 (FRA-I), GATA3, GSN (겔솔린), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST (당단백질 130), ITGA6 (a6 인테그린), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki- 67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, SERPINB5 (마스 핀), SERPINE1 (PAI-I), TGFA, THBS1 (트롬보스폰딘-1), TIE (Tie-1), TNFRSF6 (Fas), TNFSF6 (FasL), TOP2A (토포이소머라제 Iia), TP53, AZGP1 (zinc-a-당단백질), BPAG1 (플렉틴), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7 (클라우딘-7), CLU (클루스테린), ERBB2 (Her-2), FGF1, FLRT1 (피브로넥틴), GABRP (GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6 (a6 인테그린), ITGB4 (b 4 인테그린), KLF5 (GC Box BP), KRT1 9 (케라틴 19), KRTHB6 (모발 특이적 II형 케라틴), MACMARCKS, MT3 (메탈로티오넥틴-III), MUC1 (뮤신), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2 (리포필린 B), SCGB2A1 (mamaglobin 2), SCGB2A2 (mamaglobin 1), SPRR1B (Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, 및 TNFAIP2 (B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, 포스파티딜세린, ROBO4, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR 알파, PDGFR 베타, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1, 및 CD59.

[0321] **IV. 약제학적 조성물**

[0322] 또한, 본 발명은 본 발명의 결합 단백질과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 장애를 진단, 검출 또는 모니터링하거나 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방(예를 들면, 질환, 장애 또는 다른 증상의 시작을 억제 또는 지연), 치료, 처리 또는 완화시키고/시키거나 연구에 사용하기 위한 것이다. 특정 양태에서, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질을 포함한다. 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질, 및 본 발명의 결합 단백질 이외에 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 예방제 또는 치료제를 포함한다. 하나의 양태에서, 예방제 또는 치료제는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 처리 또는 완화시키는데 유용한 것으로 공지되거나 이에 사용되었거나 현재 사용중인 것들이다. 이들 양태에 따라, 당해 조성물은 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0323] 본 발명의 결합 단백질은 피검체에 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "약제학적으로 허용되는 담체"란 용어에는 생리학적으로 화합성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 피복, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예에는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 중의 하나 이상 또는 이의 배합물이 포함된다. 몇몇 양태에서, 조성물에 당과 같은 등장제, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알콜 또는 염화나트륨이 포함되는 것이 바람직하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 추가로 향체 또는 향체 일부의 유효 수명이나 효과를 증강시키는 습윤화제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 보조 물질을 소량 포함할 수도 있다.

[0324] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있고 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방하거나 처리하거나 치료하거나 완화시키는데 유용한 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 본 발명의 조합된 하나 이상의 항체 및 예방제 또는 치료제를 투여하는데 사용될 수 있고, 리포솜내 캡슐화제, 미세입자, 미세캡슐제, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 세포내이입[예를 들면, Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432 참조], 레트로바이러스 또는 기타 벡터 등의 일부로서 핵산의 작제를 예로 들 수 있다. 본 발명의 예방제 또는 치료제를 투여하는 방법은 비경구 투여(예를 들어, 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 뇌척수 경막외 투여, 종양내 투여 및 점막 투여 (예를 들어, 비내 및 경구 경로)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 흡입기 또는 분무기 및 분무제를 갖는 계형을 사용하는 폐 투여가 사용될 수 있다[미국 특허 6, 019,968, 5,985, 320, 5,985,309, 5,934, 272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290, 540, and 4,880,078; and PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, and WO 99/66903]. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질, 병용 치료제 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR®

폐 약물 전달 기술 (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)을 사용하여 투여된다. 특정 양태에서, 본 발명의 예

방 또는 치료제는 근육내, 정맥내, 종양내, 경구적으로, 비내, 폐 또는 피하로 투여된다. 예방제 또는 치료제는 임의의 간편한 경로, 예를 들어, 주입 또는 일시 주사, 상피 또는 점막 내층(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장내 점막등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 기타 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성 또는 국소적일 수 있다.

[0325] 하나의 양태에서, 시험관내 종양 세포로의 항체 커플링된 탄소 나노튜브(CNT)의 특이적 결합에 이어서 근적외선(NIR) 광을 사용한 이들의 고도로 특이적인 절제는 종양 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 비오틴화된 극성 지질은 1개 또는 2개의 상이한 하나 이상의 종양 항원(예를 들어, CD22)에 대해 지시된 뉴트리린 라이트 아비딘-유도체화된 DVD-Ig에 부착된 안정한, 생적합성, 비세포독성 CNT 분산제를 제조하기 위해 사용될 수 있다(문헌참조: Chakravarty, P. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8697-8702).

[0326] 특정 양태에서, 치료를 필요로 하는 영역에 본 발명의 예방제 또는 치료제를 국소적으로 투여하는 것이 요구될 수 있다. 이것은 예를 들어, 비제한적으로, 국소 주입, 주사 또는 임플란트에 의해 달성될 수 있고 당해 임플란트는 막 및 매트릭스, 예를 들어, 시알라스틱 막, 중합체, 섬유성 매트릭스(예를 들어, Tissuel<sup>®</sup>

) 또는 콜라겐 매트릭스를 포함하는 다공성 또는 비-다공성 물질로 이루어진다. 한 양태에서, 본 발명의 길항제인 유효량의 하나 이상의 항체는 장애 또는 이의 증상을 예방, 치료, 처리 및/또는 완화시키기 위해 피검체의 환부에 국소적으로 투여된다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 유효량의 하나 이상의 항체는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 처리 및/또는 완화시키기 위해 본 발명의 피검체 외에도 유효량의 하나 이상의 치료제(예를 들어, 하나 이상의 예방제 또는 치료제)와 병용하여 피검체의 환부에 국소적으로 투여된다.

[0327] 또 다른 양태에서, 예방제 또는 치료제는 제어 방출 또는 지연 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 양태에서, 펌프를 사용하여 조절된 또는 지연된 방출을 달성할 수 있다(Langer, supra; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507; Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574 참조). 또 다른 양태에서, 중합체를 사용하여 본 발명의 치료제의 조절되거나 지연된 방출을 달성할 수 있다[예를 들면, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas (1983) J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 참조; 또한 Levy et al. (1985) Science 228:190; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105]; 미국 특허 No. 5,679,377; 미국 특허 No. 5,916,597; 미국 특허 No. 5,912,015; 미국 특허 No. 5,989,463; 미국 특허 No. 5,128,326; PCT 공보 No. WO 99/15154; 및 PCT 공보 No. WO 99/20253 참조]. 지연된 방출 제형에 사용되는 중합체의 예는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리언하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA) 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 양태에서, 지연된 방출 제형에 사용되는 중합체는 불활성이고, 누출되는 불순물이 없고, 저장 시 안정하고 생분해성이다. 또 다른 양태에서, 조절되거나 지연된 방출 시스템은 예방제 또는 치료제와 근접하게 위치됨에 따라서 전신 투여량의 일부만을 필요로 한다(Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

[0328] 조절된 방출 시스템은 문헌[Langer (1990) Science 249:1527-1533]]에서 논의되었다. 당업자에게 공지된 임의의 기술을 사용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지연된 방출 제형을 제조할 수 있다[예를 들면, 미국 특허 No. 4,526,938, PCT 공보 WO 91/05548, PCT 공보 WO 96/20698, Ning et al. (1996) Radiotherap. Oncol. 39: 179-189; Song et al. (1995) PDA J. Pharma. Sci. Tech. 50:372-397; Cleek et al. (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 및 Lam et al. (1997) Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760 참조].

[0329] 본 발명의 조성물이 예방제 또는 치료제를 암호화하는 핵산인 특정 양태에서, 핵산은 생체내 투여되어 암호화된 예방제 또는 치료제의 발현을 촉진시킬 수 있고 당해 핵산은 적당한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성되고 이것이 세포내로 투여되도록 하며, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터(미국 특허 No. 4,980,286) 또는 직접 주사 또는 미세입자 충격(예를 들어, 유전자 총; 마이올리스틱, 듀폰트) 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염제로의 피복을 투여에 사용하거나 핵으로 진입하는 것으로 공지된 호메오박스형 펩타이드에 연결시켜 투여한다(예를 들면, Joliot et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 참조). 또한, 핵산은 세포내로 도입되고 발현을 위해 상동성 재조합에 의해 숙주 세포 DNA 내로 통합된다.

- [0330] 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로와 양립할 수 있도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어, 정맥내, 피내, 피하, 경구, 비내(예를 들어, 흡입), 경피(예를 들어, 국소), 경점막 및 직장 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 당해 조성물은 사람에게 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비내 또는 경구 투여용으로 채택된 약제학적 조성물로서 통상적인 과정에 따라 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장 수성 완충액중의 용액이다. 필요한 경우, 당해 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위에서 통증을 완화하기 위한 리그노캠과 같은 국소 마취제를 함유할 수 있다.
- [0331] 본 발명의 조성물이 국소적으로 투여되어야만 하는 경우, 당해 조성물은 연고, 크림, 경피 패취, 로션, 젤, 샴프, 분무제, 에어로졸 또는 당업자에게 널리 공지된 기타 형태로 제형화될 수 있다[Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]. 하나의 양태에서, 분무 불가능한 국소 투여 형태를 위해, 통상적으로 국소 적용과 양립할 수 있는 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하고 바람직하게 물 보다 큰 역학 점도를 갖는 조성물이 사용될 수 있다. 적합한 제형은 제한없이 용제, 현탁제, 유제, 크림, 연고, 산제, 도찰제, 고약등을 포함하고 경우에 따라 이들은 예를 들어, 삼투압과 같은 다양한 성질에 영향을 미치기 위해 보조제(예를 들어, 방부제, 안정화제, 습윤화제, 완충제 또는 염)과 함께 멸균되거나 혼합된다. 기타 적합한 국소 투여 형태는 바람직하게 고체 또는 액체 불활성 담체와 배합된 활성 성분이 가압된 휘발성 물질(예를 들어, 가스 추진제, 예를 들어, 프레온)과의 혼합물 또는 압착병에 캡킹된 분무 가능한 에어로졸 제제를 포함한다. 수분화제 또는 보습제가 또한 경우에 따라 약제학적 조성물 및 투여 형태에 첨가될 수 있다. 당해 추가의 성분의 예는 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0332] 본 발명의 방법이 조성물의 비내 투여를 포함하는 경우, 당해 조성물은 에어로졸 형태, 분무, 연무 또는 적가 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는 간편하게 가압된 펌프 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 제공 형태로 적합한 추진제(예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스)의 사용과 함께 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우에, 용량 단위는 계량된 양이 전달되도록 밸브를 설치하여 측정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 캡셀제 및 카트릿지(예를 들어, 젤라틴으로 구성된)는 화합물 및 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화될 수 있다.
- [0333] 본 발명의 방법이 경구 투여를 포함하는 경우, 당해 조성물은 정제, 캡셀제, 카세트, 젤캡, 용제, 현탁제의 형태로 경구적으로 제형화될 수 있다. 정제 또는 캡셀제는 결합제(예를 들어, 예비젤화된 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들어, 락토스, 미세결정 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트) 또는 습윤화제(예를 들어, 나트륨 라우릴 설페이트)와 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 통상적인 수단으로 제조될 수 있다. 정제는 당업자에게 널리 공지된 방법으로 피복될 수 있다. 경구 투여용 액상 제제는 제한 없이 용제, 시럽 또는 현탁제 형태를 취할 수 있거나 이들은 사용전에 물 또는 기타 적합한 비히클과의 구성을 위해 무수 생성물로서 제공될 수 있다. 당해 액상 제제는 현탁화제(예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들어, 렉시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예를 들어, 아몬드유, 오일 에스테르, 에틸 알콜 또는 분획화된 식물성 오일) 및 방부제(예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 같은 약제학적으로 허용되는 첨가제를 사용한 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 당해 제제는 또한 적절하게 완충염, 향제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다. 경구 투여용 제제는 적합하게 예방제 또는 치료제의 느린 방출, 조절된 방출 또는 지연된 방출용으로 제형화될 수 있다.
- [0334] 본 발명의 방법은 예를 들어, 흡입기 또는 분무기를 사용함에 의해 분무화제로 제형화된 조성물을 폐 투여함을 포함할 수 있다[미국 특허 번호 제6,019,968호, 제5,985,320호, 제5,985,309호, 제5,934,272호, 제5,874,064호, 제5,855,913호, 제5,290,540호, 및 제4,880,078호; 및 PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, 및 WO 99/66903]. 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질, 병용 치료제 및/또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR<sup>®</sup>
- 폐 약물 전달 기술(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)을 사용하여 투여된다.
- [0335] 본 발명의 방법은 주사(예를 들어, 일시 주사 또는 연속 주입)에 의해 비경구 투여용으로 제형화된 조성물을 투여함을 포함할 수 있다. 주사용 제형은 방부제 첨가와 함께 단위 용량 형태(예를 들어, 앰пу울 또는 다용량 컨테이너)로 제공될 수 있다. 당해 조성물은 현탁제, 용제 또는 유제와 같은 형태를 취할 수 있고 현탁화제, 가용화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 또는, 활성 성분은 사용전에 적합한 비히클(예를

들어, 멸균 발원원 부재 물)과의 구성을 위해 분말 형태일 수 있다.

[0336] 본 발명의 방법은 추가로 데포우 제제로서 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 당해 오래 지속적인 제제는 이식(예를 들어, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 당해 조성물은 적합한 중합체 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용되는 오일중 유제로서) 또는 이온 교환수지, 또는 불량한 가용성 유도체 (예를 들어, 불량한 가용성 염으로서)로 제형화될 수 있다.

[0337] 본 발명의 방법은 중성 또는 염 형태로서 제형화된 조성물의 투여를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산등으로부터 유래된 것들과 같은 음이온과 함께 형성된 것들 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 제2 수산화철, 이소프로필아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[0338] 일반적으로, 조성물의 성분은 별도로 함께 혼합하여, 예를 들어, 앰푸울 또는 사샤프트(활성제의 양을 나타냄)와 같은 밀폐된 컨테이너에서 무수 동결건조된 분말 또는 물 부재 농축물로서 단위 용량 형태로 공급된다. 투여 방식이 주입인 경우, 조성물은 멸균 약제학적 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 주입 병으로 분배될 수 있다. 투여 방식이 주사에 의한 것인 경우, 멸균 주사용수 또는 식염수의 앰푸울을 제공하여 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있다.

[0339] 특히, 본 발명은 또한 예방제 또는 치료제, 또는 본 발명의 약제학적 조성물이 제제의 양을 나타내는 앰푸울 또는 사샤프트와 같은 밀폐된 컨테이너에 패키징된 것을 제공한다. 한 양태에서, 하나 이상의 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 밀폐된 컨테이너에서 무수 멸균된 동결건조된 분말 또는 물 부재 농축물로서 공급되고 피검체 투여용으로 적당한 농도로 재구성(예를 들어, 물 또는 식염수와 함께)될 수 있다. 하나의 양태에서, 하나 이상의 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 밀폐된 컨테이너에 무수 멸균 동결건조된 분말로서 제공되고 단위 용량은 5 mg 이상, 보다 바람직하게는 10 mg 이상, 15 mg 이상, 25 mg 이상, 35 mg 이상, 45 mg 이상, 50 mg 이상, 75 mg 이상 또는 100 mg 이상이다. 동결건조된 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 본래의 컨테이너에 2°C 내지 8°C에서 저장되어야만 하고 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 재구성된 후 1주 이내, 바람직하게는 5일 이내, 72시간 이내, 48시간 이내, 24시간 이내, 12시간 이내, 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 1시간 이내에 투여되어야만 한다. 선택적인 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 제제의 양 및 농도를 나타내는 밀폐된 컨테이너에서 액체 형태로 공급된다. 한 양태에서, 투여된 조성물의 액체 형태는 밀폐된 컨테이너에 0.25 mg/ml 이상, 보다 바람직하게는 0.5 mg/ml 이상, 1 mg/ml 이상, 2.5 mg/ml 이상, 5 mg/ml 이상, 8 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 15 mg/ml 이상, 25 mg/ml 이상, 50 mg/ml 이상, 75 mg/ml 이상 또는 100 mg/ml 이상으로 공급된다. 액체 형태는 이의 본래의 컨테이너에 2°C 내지 8°C에서 저장되어야만 한다.

[0340] 본 발명의 결합 단백질은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 한 양태에서, 항체 또는 항체 일부는 항체 0.1 내지 250mg/ml를 포함하는 주사 용액으로 제조하는 것이 바람직하다. 주사 용액은 플린트 또는 호박색 바이엘, 앰플 또는 사전충진 주사기 중의 액체 또는 동결건조 투여 형태로 구성될 수 있다. 완충액은 pH 5.0 내지 7.0(최적으로는 pH 6.0)의 L-히스티딘(1-50mM), 최적으로는 5-10mM일 수 있다. 다른 적당한 완충액으로는 석신산나트륨, 구연산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨이 있으나, 이에 국한되지 않는다. 염화나트륨은 0 내지 300mM(액체 투여 형태인 경우 최적으로는 150mM)의 농도로 용액의 독성을 개질하는데 사용될 수 있다. 동결건조 투여 형태에는 동결방지제, 주로 0 내지 10% 슈크로스(최적으로는 0.5 내지 1.0%)가 첨가될 수 있다. 다른 적당한 동결방지제에는 트레할로스 및 락토스가 있다. 다른 적당한 벌크 제제(Bulking agent)에는 글리신, 및 아르기닌(이들 중 어느 것이든지 0 내지 0.05% 농도로 포함될 수 있다), 및 폴리소르베이트-80(최적으로는 0.005 내지 0.01%의 농도로 포함)가 포함된다. 또 다른 계면활성제에는 폴리소르베이트 20 및 BRIJ 계면활성제가 있으나, 이에 국한되지 않는다. 비경구 투여용의 주사가능한 용액으로 제조된 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 보조제로서 유용한 제제, 예를 들어, 치료학적 단백질(예를 들어, 항체)의 흡수 또는 분산을 증가시키는데 사용되는 것들을 추가로 포함할 수 있다. 특히 유용한 보조제는 Hylenex®

과 같은 하이알루로니다제(재조합 사람 하이알루로니다제)이다. 주사가능한 용액중에 하이알루로니다제의 첨가는 비경구 투여 후, 특히 피하 투여 후 사람 생물유용성을 개선시킨다. 이는 또한 보다 큰 주사 부위 용적(즉 1ml 초과)을 가능하게 하고 통증 및 불편감이 덜하고 주사 부위 반응이 최소로 발생한다(PCT 공보 No. WO 2004/078140, 및 미국 특허 공개 No. 2006/104968 참조).

[0341] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이러한 형태에는 예컨대 액체, 반고체 및 고체 투여 형태, 예컨대 액체 용액(예, 주사 용액 및 주입 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환제, 산제, 리포솜 및 좌약 등이 포함된다.

다. 바람직한 형태는 의도하는 투여 방식 및 치료 용도마다 다르다. 일반적으로 바람직한 조성물은 주사 용액 또는 주입 용액 형태, 예컨대 다른 항체로 사람을 수동 면역화하는데 사용되는 조성물과 유사한 조성물이다. 선택한 투여 방식은 비경구(예컨대, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내) 방식이다. 한 양태에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 또 다른 양태에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사로 투여된다.

[0342] 치료학적 조성물은 일반적으로 멸균될 수 있고 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 한다. 이러한 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 분산액, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적당한 다른 주문 구조로 조제될 수 있다. 멸균 주사 용액은 필요량의 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 일부)을, 필요에 따라 앞에서 열거한 성분 중 하나 또는 성분의 조합과 함께 적당한 용매에서 혼합한 다음, 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질과 필요에 따라 전술한 다른 성분을 포함하는 멸균 매개체에 활성 화합물을 첨가하여 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조에 유용한 멸균 동결건조 분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 전술한 멸균 여과 용액으로부터 활성 성분과 임의의 바람직한 추가 성분의 분말을 제공하는 진공 건조 및 분무 건조이다. 용액의 적당한 유체성은 예컨대 레시틴과 같은 피복의 사용, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용을 통해 유지될 수 있다. 주사 조성물의 지속적 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예컨대 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 첨가하여 제공할 수 있다.

[0343] 본 발명의 결합 단백질은 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 투여할 수 있지만, 다양한 치료학적 용도에서 바람직한 투여 경로/방식은 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이다. 당업자라면 잘 알고 있듯이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라진다. 특정 양태에서, 활성 화합물은 이 화합물이 신속 방출되지 않게 하는 담체와 함께 조제될 수 있으며, 그 예에는 임플란트, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제형이 있다. 여기에는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생체분해성, 생체화합성 중합체가 사용될 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 다수의 방법은 특허되어 있거나 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다[예컨대, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978].

[0344] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 예컨대 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 이러한 화합물(및 필요한 경우 다른 성분)은 또한 경질 또는 연질 외피의 젤라틴 캡슐에 충전되거나, 정제로 압착되거나 또는 피검체 식이에 직접 첨가될 수도 있다. 경구 치료 투여용인 경우, 상기 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취성 정제, 흡수 정제, 트로키, 캡슐; 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여의 다른 방식으로 본 발명의 화합물을 투여하기 위해서는 화합물을 불활성화 방지용 물질로 피복하거나 또는 상기 방지용 물질과 함께 공동 투여할 필요가 있을 수 있다.

[0345] 또한, 보충적 활성 화합물이 상기 조성물에 첨가될 수도 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 본 발명의 결합 단백질과 함께 장애를 치료하기에 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 공동제형화되고/되거나 동시 투여된다. 예를 들어, 본 발명의 결합 단백질은 다른 표적(예컨대, 다른 사이토킨에 결합하거나 세포 표면 분자에 결합하는 항체)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체와 공동조제 및/또는 공동투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 항체는 전술한 치료제 2종 이상과 함께 사용될 수 있다. 이러한 병용 치료는 투여되는 치료제를 보다 낮은 투여량으로 사용할 수 있게 하여 각종 단독치료법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있으므로 바람직하다.

[0346] 특정 양태에서, 결합 단백질은 당업계에서 공지된 반감기 연장 비히클에 연결되기도 한다. 이러한 비히클에는 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 및 텍스트란이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 비히클은 미국 특허 6,660,843 및 공개된 PCT 공보 WO 99/25044에 기술되어 있다.

[0347] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질을 암호화하는 핵산 서열 또는 또 다른 예방제 또는 치료제는 유전자 치료에 의해 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 치료, 예방, 처리하거나 완화시키기 위해 투여된다. 유전자 치료법은 피검체에게 발현되거나 발현 가능한 핵산을 투여함에 의해 수행되는 치료법을 언급한다. 본 발명의 당해 양태에서, 핵산은 예방 또는 치료 효과를 매개하는 이의 암호화된 본 발명의 항체 또는 예방제 또는 치료제를 생산한다.

[0348] 당업계에서 유용한 임의의 유전자 치료법이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 유전자 치료법의 일반적인 검토를 위해 문헌[Goldspiel et al. (1993) Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; 및 Morgan and Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May (1993) TIBTECH 11(5):155-215]을 참조한다. 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술에 관해 당업계에서 일반적으로 공지된 방법은 문헌[Ausubel et al.

(eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]에 기재되어 있다. 다양한 유전자 치료법에 대한 상세한 설명은 문헌[미국 특허 공개 No. 20090297514]에 기재되어 있다.

[0349]

본 발명의 결합 단백질은 결합 단백질에 의해 인식되는 표적이 해로운 각종 질환을 치료하는데 유용하다. 이러한 질병에는 류마티스성 관절염, 골관절염, 소아만성관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응관절염, 척추관절염, 전신홍반루푸스, 크론병, 궤양성 결장염, 염증장염, 인슐린 의존 당뇨병, 갑상샘염, 천식, 알레르기병, 건선, 피부경화증, 이식대숙주병, 기관 이식거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역병, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브스병, 신장증후군, 만성피로증후군, 베게너 육아종증, 헨녹-쇼라인 자반증(Henoch-Schonlein purpura), 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질병, 기생충병, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅턴씨 무도병, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 졸중, 원발성 담관성간경화증, 용혈빈혈, 악성암, 심장부전, 심근경색, 애디슨씨병, 산발성, 다선성 결핍 I형 및 다선성 결핍 II형, 슈미트씨 증후군, 성인(급성) 호흡곤란증후군, 탈모증, 원형탈모증, 흡혈성 관절염, 관절염, 라이터씨병, 건선관절염, 궤양성결장염 관절염, 창자병 윤활막염, 클라미디아증, 에르시니아 및 살모넬라 관련 관절염, 척추관절염, 죽상병/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역수포병, 보통천포창, 낙엽천포창, 유사천포창, 선형 IgA 병, 자가면역 용혈빈혈, 콕스 양성 용혈빈혈, 후천성 악성빈혈, 소아악성빈혈, 근육통성 뇌염/로알 프리병(Royal Free Disease), 만성 점막피부칸디다증, 거대세포 동맥염, 원발성 경화증 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍증후군, 후천성 면역결핍 관련병, B형 간염, C형 간염, 공통가변성면역결핍(공통가변성 저감마글로불린혈증), 확장성 심근증, 여성 불임, 난소부전증, 조숙 난소부전, 섬유소성 폐질환, 잠복성 섬유화 폐포염, 염증후 간질성 폐질환, 간질성 폐렴, 결합조직병 관련 간질성 폐병, 복합 결합조직병 관련 폐병, 전신 경화증 관련 간질성 폐병, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐병, 전신홍반루푸스 관련 폐병, 피부근육염/다발근육염 관련 폐병, 쇼그렌병 관련 폐병, 강직척추염 관련 폐병, 혈관염성 광범위 폐병, 혈철소증 관련 폐병, 약물 유도 간질성 폐병, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐쇄세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤 폐병, 감염후 간질성 폐병, 통풍 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염(고전적 자가면역 또는 루푸스 간염), 2형 자가면역 간염(항LKM 항체 간염), 자가면역 매개 저혈당증, 흑색가시세포종 관련 B형 인슐린 내성, 부갑상샘항진증, 기관 이식 관련 급성 면역 질환, 기관 이식 관련 만성 면역 질환, 골관절염, 원발성 경화담관염, 1형 건선, 2형 건선, 특발 백혈구감소증, 자가면역 호중구 감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원반형 홍반루푸스, 특발성 또는 NOS 남성 불임, 정자 자가면역성, 다발성 경화증(모든 아형), 교감성 안염, 결합조직 질환에 부차적인 폐 고혈압, 굿파스처 증후군, 결절다발동맥염의 폐동맥 징후, 급성 류마티스열, 류마티스성 척추염, 스틸스병, 전신 경화증, 쇼그렌 증후군, 다카야스씨병/동맥염, 자가면역 저혈소판증, 특발 저혈소판증, 자가면역 갑상샘 질환, 갑상샘항진증, 갑상샘종 자가면역 갑상샘항진증(하시모토씨병), 위축 자가면역 갑상샘항진증, 원발성 점액부종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증, 급성 간질환, 만성 간질환, 알콜간경화증, 알콜 유도 간 손상, 담즙정체, 특이 간질환, 약물 유도 간염, 비알콜성 지방간염, 알레르기 및 천식, 그룹 B 스트렙토코커스(GBS) 감염, 정신 질환(예, 우울증 및 정신분열병), Th2 타입 및 Th1 타입 매개 병, 급성 및 만성 통증 및 암, 예컨대 폐, 유방, 위, 방광, 결장, 췌장, 난소, 전립선 및 직장의 암 및 조혈계 암(백혈병 및 림프종), A베타지방단백질혈증, 말초청색증, 급성 및 만성 기생충성 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프성모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신부전증, 선암증, 공기 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알콜 유도 간염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍, 근위축성 측삭 경화증, 빈혈, 양기나 협심증, 전각 세포 퇴화, 항 cd3 치료, 항 인지질 증후군, 항-수용체 과민성 반응, 대동맥 및 말초 결찰증, 대동맥 해부, 동맥 고혈압, 동맥경화증, 동정맥 누공, 운동실조증, 심방세동 (지연 또는 발작성), 심방조동, 동정맥 막힘, B 세포 림프종, 골 이식 거부, 골수 이식 (BMT) 거부, 좌각차단, 버키트 림프종, 화상, 심장성 부정맥, 심장성 기절 증후군, 심장 종양, 심근증, 심폐 우회 염증 반응, 연골 이식 거부, 소뇌피질 퇴화, 소뇌 장애, 혼란 또는 다초점 심방 빈맥, 화학치료 관련 장애, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 알콜증, 만성 염증 병리, 만성 림프성 백혈병 (CLL), 만성 폐쇄 폐 질환(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 결합조직 암종, 울혈성 심부전, 결막염, 접촉성 피부염, 폐 심장, 관상 동맥 질환, 크루츠펠트-자콕(Creutzfeldt-Jakob) 질환, 배양 음성 패혈증, 낭성유증, 사이토 킨 치료 관련 장애, 권투선수치매(Dementia pugilistica), 탈수초성질환, 당기 출혈열, 피부염, 피부학적 증상, 당뇨병, 진성 당뇨병, 당뇨병성 동맥경화 질환(diabetic atherosclerotic disease), 광범위 루이체 질환, 확장성 울혈성 심근증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군, CNS 도파민 수용체 차단 약물에 의해 유도된 약물 유도 운동 장애, 약물 과민증, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비질환, 후두개염, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 피

부홍통증, 추체외로 및 소뇌 장애, 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 태아 흉선 이식 거부, 프리드리히 운동 실조증, 기능성 말초 동맥 장애, 진균류 패혈증, 가스피저, 위궤양, 사구체신염, 임의의 기관 또는 조직 이식 거부, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 모발 세포 백혈병, 할레르덴-스파츠 질환(Hallerrorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염, 고초열, 심장 이식 거부, 혈액소증, 혈액투석, 용혈성 요독증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증, 출혈, 간염(A), 히스 다발 부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨 질환, 과운동성 장애, 과민성 반응, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동 부족 장애, 시상하부-뇌하수체-부신피질계 평가, 특발성 애디슨 질환, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개 세포독성, 무력증, 유아 척추 근육 위축증, 대동맥 염증, 인플루엔자 A, 이온화 방사선 노출, 홍채섬모체염/자궁염/광학적 신경근염, 허혈 관류 손상, 허혈 뇌졸중, 연소성 류마티스 관절염, 연소성 척추 근육 위축증, 카포시 육종, 신장 이식 거부, 레지오넬라, 리슈마니아증, 나병, 피질척수계 병변, 지방부종, 간 이식 거부, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 뇌막염, 수막염 균혈증, 대사/특발성, 편두통, 미토콘드리아 다중 시스템 장애, 복합 연결 조직 질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발성 골수종, 다발성 시스템 퇴화(만셀 테제린-토마스 쉬-드라거 및 마차도-조셉), 중증 근무력증, 세포내 마이코박테리움 감염증, 마이코박테리움 결핵, 골수이형성증후군, 심근 경색, 심근 허혈 장애, 비인두 암종, 신생아 만성 폐 질환, 신염, 신증, 신경퇴행성 질환, 신경성 I 근육 위축증, 호중구감소성 발열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 지류 폐색, 폐색성 동맥 질환, okt3 치료, 고환염/부고환염, 고환염/절관절제술 반전 과정, 기비대, 골다공증, 췌장 이식 거부, 췌장 암종, 부수종양성 증후군/악성 고칼슘혈증, 부갑상선 이식 거부, 골반 염증 질환, 다년성 비염, 심막 질환, 말초 동맥경화 질환, 말초 혈관 장애, 복막염, 악성빈혈, 폐포자충 폐렴, 폐렴, POEMS 증후군 (다발신경병증, 장기비대, 내분비질환, 모노클로날 감마글로불린혈증, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펄프후 증후군, MI 후 심장절개 증후군, 자간 전증, 전진적 상해 마비, 원발성 폐 고혈압, 방사선 치료, 레이노드 현상 및 질환, 레이노드 질환, 레프섬 질환, 일반 협소 QRS 심근증, 신혈관성고혈압, 재관류 손상, 제한성 심근병증, 육종, 피부경화증, 노인 무도병, 루이체형 노인성 치매, 혈청음성 관절병증, 쇼크, 겸상적혈구 빈혈증, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식 거부, 고형 종양, 특이적 부정맥, 척수운동실조, 척수소뇌 퇴화, 스트렙토코커스 근염, 소뇌 구조적 병변, 아급성 경화성 범뇌염, 실신, 심혈관계 매독, 전신 아나팔락시스, 전신 염증 반응 증후군, 전신 개시 연소성 류마티스 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 말초혈관 확장증, 폐색성 혈전 혈관염, 혈소판감소증, 독성, 이식, 외상/출혈, III형 과민성 반응, IV형 과민성, 불안정 양기나, 요독증, 요로패혈증, 두드러기, 승모판 심장 질환, 하지 정맥, 혈관염, 정맥동 질환, 정맥종 혈전증, 심실 세동, 바이러스 및 진균류 감염, 바이탈 뇌염/무균성 수막염, 바이탈-연관 적혈구식작용 증후군, 웨른니케-코르사코프 증후군, 윌슨 질환, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(PCT 공보 No. WO 2002/097048; WO 95/24918; 및 WO 00/56772 참조).

[0350] 본 발명의 DVD-Ig는 또한 하기의 질환 중 하나 이상을 치료할 수 있다: 급성 관상 증후군, 급성 특발성 다발신경근염, 급성 염증 탈수초성 다발성 신경염, 급성 허혈, 성인 스틸스 질환, 원형탈모증, 아나필락시스증(anaphylaxis), 항-인지질 항체 증후군, 재생불량성빈혈, 동맥경화증, 아토피성 습진, 아토피성 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염과 관련된 자가면역 장애, 자가면역 난청, 자가면역 림프구증식성 증후군(ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 혈소판감소증(AITP), 안건염, 기관지확장증, 수포성 유천포창, 심혈관 질환, 악성 항인지질 증후군, 셀리악 질환(celiac disease), 경추 척추증, 만성 허혈, 반흔성 유천포창, 다발성 경화에 대한 위험을 갖는 임상적으로 분리된 증후군(CIS), 결막염, 유년기 개시 정신성 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 누낭염, 피부근염, 당뇨 망막증, 진성 당뇨병, 요추간반탈출증, 추간관내장증, 약물 유도 면역 용혈성 빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 내안구염, 결공막염, 다형홍반, 중증 다형홍반, 임신성 유천포창, 길레인 바레 증후군(Guillain-Barre syndrome)(GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨 질환, 특발성 간질 폐렴, IgE 매개된 알레르기, 면역 용혈성 빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구 염증 질환, 염증 탈수초 질환, 염증 심장 질환, 염증 신장 질환, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성각결막염, 쿠스마울 질환 또는 쿠스마울-마이어 질환, 란드리 마비, 랑게르한스 세포 조직구증, 열성홍반(livedo reticularis), 황반변성, 미시적 혈관염, 경직성 척추염, 운동 뉴런 장애, 점막 유천포창, 다발성 기관 부전증, 중증 근무력증, 골수이형성 증후군, 심근염, 신경근 장애, 신경병증, 비-A 비-B 간염, 시신경염, 골용해, 난소암, 소수관절 JRA, 말초 동맥 폐색성 질환(PAOD), 말초 혈관 질환(PVD), 말초 동맥 질환(PAD), 정맥염, 결절성 다발 동맥염(또는 결절성 동맥주위염), 다발연골염, 측두동맥염, 회색질척수염, 다발성 관절 JRA, 다발성 내분비 결핍 증후군, 다발성근염, 류마티스성 다발성 근육통(PMR), 펄프 후 증후군, 1차 파킨슨병, 전립선 및 직장암 및 조혈 악성(백혈병 및 림프종), 전립선염, 순수적혈구 저형성증, 1차 부신 부전증, 재발성 시속신경근염, 협착증, 류마티스 심장 질환, 사포(활막염, 여드름, 농포증, 및 골염), 피부경화증, 2차 아밀로이드증, 폐 쇼크, 상공막염, 좌골신경통, 2차

부신 부전증, 실리콘 관련 연결 조직 질환, 스네돈-윌킨슨(sneddon-wilkinson) 피부증, 강직성 척추염, 스티븐-존슨 증후군 (SJS), 전신 염증 반응 증후군, 일시적 동맥염, 특소플라스믹 망막증, 독성 표피 괴사, 횡단척수염, TRAPS (종양 괴사 인자 수용체, 1형 알레르기 반응, II형 당뇨병, 두드러기, 통상의 간질 폐렴 (UIP), 혈관염, 준계각결막염, 바이러스 망막염, 보그트-고야나기-하라다 증후군 (VKH 증후군), 습윤 황반 퇴화 및 상처 치료.

[0351] 본 발명의 결합 단백질은 자가면역 질환, 특히, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 알레르기, 자가면역 당뇨병 및 자가면역 포도막염을 포함하는, 염증과 관련된 자가면역 질환을 앓는 사람을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부를 사용하여 류마티스 관절염, 크론 질환, 다발성 경화증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병 및 건선을 치료하기 위해 사용된다.

[0352] 하나의 양태에서, 본 발명의 조성물과 방법으로 치료되거나 진단될 수 있는 질환은 유방암, 결장암, 직장암, 폐암, 구인두암, 두경부암, 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 방광암 및 담관암, 소장암, 노관암(신장암, 방광암 및 요상피암을 포함), 여성 생식관암 (경부암, 자궁암 및 난소암, 및 융모막상피종 및 생식 융모상피성 질환), 남성 생식관암 (전립선암, 저정낭암, 고환암 및 생식 세포 종양을 포함), 내분비선암 (갑상선암, 부신암 및 뇌하수체암을 포함), 및 피부암, 및 혈관종, 흑색종, 육종 (골 기원 암 및 연조직 기원의 암 및 카포시 육종을 포함), 뇌암, 신경암, 안구암, 및 수막암 (성상세포종, 신경아교종, 아교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 양성종양, 및 수막종을 포함), 조혈 악성 종양으로 유래되는 고형 종양, 예를 들어, 백혈병 및 림프종(호지킨 및 비호지킨 림프종 둘다)를 포함하는, 원발성 및 전이성 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0353] 하나의 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 단독으로 또는 방사선치료 및/또는 다른 화학치료제와 조합하여 사용되는 경우 암을 치료하거나 본원에 기재된 종양으로부터의 전이를 예방 또는 억제하기 위해 사용된다.

[0354] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 항신생물제, 방사선치료 및 화학치료제(예를 들어, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카보플라틴, 항-튜불린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁솔, 독소루비신, 겐시타빈, 겐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸, 수용체 티로신 키나제 억제제(예를 들어, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예를 들어, 셀렉코시브), 키나제 억제제 및 siRNA))를 포함하지만 이에 제한되지 않는 제제와 배합될 수 있다.

[0355] 또한, 본 발명의 결합 단백질은 각종 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다.

[0356] 본 발명의 결합 단백질은 전술한 질환의 치료에 단독으로 또는 배합물로서 사용될 수 있다. 당해 결합 단백질은 단독으로 사용되거나 또는 의도한 목적에 따라 당업자에 의해 선택된 추가 제제, 예컨대 치료제와 함께 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 추가 제제는 본 발명의 항체에 의해 치료되는 질병이나 증상의 치료에 유용한 것으로 인식된 치료제 분야일 수 있다. 또한, 추가 제제는 치료 조성물에 유익한 특성을 부여하는 제제, 예컨대 조성물의 점도에 영향을 미치는 제제일 수 있다.

[0357] 또한, 본 발명에 포함되어야 하는 배합물은 의도한 목적에 유용한 배합물로 이해되어야 한다. 이하에 설명되는 제제는 예시적 제제로서, 한정하기 위한 것이 아니다. 본 발명의 일부인 배합물은 본 발명의 항체와 이하에 기술되는 목록 중에서 선택되는 하나 이상의 추가 제제일 수 있다. 이러한 배합물은 또한 하나 이상의 추가 제제를 포함할 수 있으며, 예를 들어 형성된 조성물이 의도한 기능을 수행할 수 있을 정도의 배합이라면 2개 또는 3개의 추가 제제가 첨가될 수도 있다.

[0358] 자가면역 및 염증 질환을 치료하기 위한 바람직한 배합물은 이부프로펜과 같은 약물을 포함하는 NSAID로 언급되기도 하는 비스테로이드 소염 약물이다. 다른 바람직한 배합물은 프레드니솔론을 비롯한 코르티코스테로이드류이며; 본 발명의 DVD Ig와 함께 환자를 치료하는 경우, 필요한 스테로이드 용량이 점감되어 스테로이드 사용 시의 공지된 부작용이 저하되거나 심지어 제거될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 결합부와 함께 류마티스성 관절염용 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 사이토킨 억제성 소염제(CSAID); 다른 사람 사이토킨 또는 성장인자(예컨대, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, 인터페론, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF)에 대한 항체 또는 길항제. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD90, 및 CTLA와 같은 세포 표면 분자 또는 이들의 리간드, 예컨대 CD154(gp39 또는 CD40L)에 대한 항체와 조합될 수 있다.

[0359] 치료제의 바람직한 배합물은 자가면역 및 후속 염증 캐스캐이드의 여러 지점에서 방해할 수 있다; 바람직한 예

에는 TNF 길항제, 예를 들어, 키메라, 사람화된 또는 사람 TNF 항체, 아달리무마브, (PCT 공개 번호 제WO 97/29131), CA2(Remicade™) CDP571, 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체, (p75TNFR1gG (Enbrel™) 또는 p55TNFR1gG (Lenercept)), 및 또한 TNF  $\alpha$  전환 효소(TACE) 억제제가 있고, 유사하게 IL-1 억제제 (인터류킨-1-전환 효소 억제제, IL-1RA등)는 동일 이유때문에 유효하다. 다른 바람직한 배합물에는 인터류킨 11 이 있다. 또 다른 바람직한 배합물은 IL-12 기능과 병행하거나, IL-12 기능에 의존적이거나 IL-12 기능과 협동적인 작용을 할 수 있는 자가면역 반응의 다른 주요 작용인자를 포함하고, 특히 IL-18 항체 또는 가용성 IL-18 수용체를 포함하는 IL-18 길항제 및 IL-18 결합 단백질이다. 확인된 바에 따르면, IL-12와 IL-18이 증폭되지만 독특한 기능을 보유하여, 이 둘에 대한 길항제의 배합물이 가장 효과적이었다. 또 다른 바람직한 배합물은 비고갈성 항-CD4 억제제이다. 또 다른 바람직한 배합물에는 공동자극 경로의 길항제 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2), 예컨대 항체, 용해성 수용체 및 길항제성 리간드 등이 포함된다.

[0360]

본 발명의 결합 단백질은 또한 메토크세이트, 6-MP, 아자티오프린 설파살라진, 메살라진, 올살라진 클로로퀸/하이드록시클로로퀸, 펜실라민, 오로티오말레이트(근육내 및 경구), 아자티오프린, 콜히친, 코르티코스테로이드(경구, 흡입 및 국소 주사), 베타-2 아드레날린수용체 효능제(살부타몰, 터부탈린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펜, 이프라트로핀 및 옥시트로핀, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAID, 예컨대 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, 전염증성 사이토킨, 예컨대 TNF- $\alpha$  또는 IL-1에 의한 시그널 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 $\beta$  전환효소 억제제, TNF- $\alpha$  전환효소(TACE) 억제제, T-세포 시그널 전달 억제제(예: 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 용해성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체(예, 용해성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFR1gG(Enbrel™ 및 p55TNFR1gG(Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, 및 sIL-6R), 소염성 사이토킨(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF $\beta$ ), 셀레코시브, 엽산, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 로페콕시브, 에타너셉트, 인플릭시마브, 나프록센, 발데콕시브, 설파살라진, 메틸프레드니솔론, 멜록시감, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 아스피린, 트리암시놀론 아세토나이드, 프로폭시펜 나프실레이트/apap, 폴레이트, 나부메돈, 디클로페낙, 피록시감, 에토돌락, 디클로페낙 나트륨, 옥사프로진, 옥시코돈 hcl, 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 펜타닐, 아나킨라, 사람 재조합체, 트라마돌 hcl, 살살레이트, 설린단, 시아노코발라민/fa/피리독신, 아세트아미노펜, 알렌드로네이트 나트륨, 프레드니솔론, 몰핀 설페이트, 리도카인 하이드로클로라이드, 인도메타신, 글루코사민 설프/콘드로이틴, 아미트립틸린 hcl, 설파디아진, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 올로파타딘 hcl, 미소프로스톨, 나프록센 나트륨, 오메프라졸, 시클로포스파미드, 리톡시마브, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18BP, 항-IL-18, 항-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, 로플루밀라스트, IC-485, CDC-801 및 메소프람 등의 제제와도 배합될 수 있다. 바람직한 배합물에는 메토크세이트 또는 레플루노미드가 있으며, 보통 또는 중증 류마티스성 관절염 증례에는 사이클로스포린이 있다.

[0361]

류마티스 관절염을 치료하기 위해 결합 단백질과 배합하여 사용될 수 있는 비제한적인 추가의 제제는 하기의 제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 비-스테로이드 소염 약물(NSAID); 사이토킨 억제 소염 약물(CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (사람화된 항-TNF  $\alpha$  항체; Celltech/Bayer); cA2/인플릭시마브 (키메라 항-TNF  $\alpha$  항체; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/에타너셉트 (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; Immunex; 예를 들면 (1994) Arther. Rheum. 37: S295; (1996) J. Invest. Med. 44: 235A 참조); 55 kdTNF-IgG (55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (비-고갈 영양류화된 항-CD4 항체; IDEC/SmithKline; 예를 들면 (1995) Arthr. Rheum. 38: S185 참조); DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2 (IL-2 융합 단백질; Seragen; 예를 들면 (1993) Arthrit. Rheum. 36: 1223); 항-Tac (사람화된 항-IL-2Ra; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (소염 사이토킨; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; 재조합 IL-10, 소염 사이토킨; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 및/또는 IL-4 효능제 (예를 들어, 효능제 항체); IL-1RA (IL-1 수용체 길항제; Synergen/Angen); 아나킨라(Kineret®

Amgen); TNF- $\beta$ p/s-TNF (가용성 TNF 결합 단백질; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S284; (1995) Amer. J. Physiol. -Heart and Circ. Physiol. 268: 37-42); R973401 (포스포디에스테라제 IV형 억제제; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S282); MK-966 (COX-2 Inhibitor; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S81); 일로프로스트(예를 들면 (1996) Arthr. Rheum.

39(9(supplement)): S82); 메토티렉세이트; 탈리도미드 (예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S282) 및 탈리도미드-관련 약물(예를 들어, 셀겐); 레플루노미드 (소염 및 사이토킨 억제제; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S131; (1996) Inflamm. Res. 45: 103-107); 트라넥삼산(플라스미노겐 활성화 억제제; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S284); T-614 (사이토킨 억제제; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S282); 프로스타글란딘 E1 (예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S282); 테니덱 (비스테로이드 소염 약물; 예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S280); 나프록센(비스테로이드 소염 약물; 예를 들면 (1996) Neuro. Report 7: 1209-1213); 멜록시캠(비스테로이드 소염 약물); 이부프로펜(비스테로이드 소염 약물); 피록시캠(비스테로이드 소염 약물); 디클로페낙 (비스테로이드 소염 약물); 인도메타신(비스테로이드 소염 약물); 셀파살라진(예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S281); 아자티오프린(예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S281); ICE 억제제(효소 인터류킨-1b 전환 효소의 억제제); zap-70 및/또는 lck 억제제 (타이로신 키나제 zap-70 또는 lck의 억제제); VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제 (혈관 내피 세포 성장 인자 또는 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체의 억제제; 혈관형성의 억제제); 코르티코스테로이드 소염 약물(예를 들어, SB203580); TNF-컨버터제 억제제; 항-IL-12 항체; 항-IL-18 항체; 인터류킨-11 (예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S296); 인터류킨-13 (예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S308); 인터류킨-17 억제제(예를 들면 (1996) Arthr. Rheum. 39(9(supplement)): S120); 금; 페니실라민; 클로로퀸; 클로람부실; 하이드록시클로로퀸; 사이클로스포린; 사이클로포스파미드; 총 림프계 조사; 항-흉선 글로불린; 항-CD4 항체; CD5-독소; 경구 투여된 펩타이드 및 콜라겐; 로벤자리트 이나트륨; 사이토킨 조절제(CRA) HP228 및 HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고-데옥시뉴클레오타이드 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 가용성 보체 수용체 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 프레드니손; 오르코테인; 글리코사미노글리칸 폴리설페이트; 미노사이클린; 항-IL2R 항체; 해양 및 식물 지질 (어류 및 식물 종자 씨드 지방산; DeLuca *et al.* (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); 아우라노 핀; 페닐부타존; 메클로페남산; 플루페남산; 정맥내 면역글로불린; 질레우톤; 아자리빈; 마이코페놀산(RS-61443); 타크롤리무스(FK-506); 시롤리무스 (라파마이신); 아미프릴로스(테라팩틴); 클라드리빈(2-클로로데옥시아데노신); 메토티렉세이트; bcl-2 억제제(참조: Bruncko, M. *et al.* (2007) *J. Med. Chem.* 50(4): 641-662); 및 항바이러스제 및 면역-조절제.

[0362]

한 양태에서, 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 류마티스 관절염 치료를 위해 하기의 제제중 하나와 배합하여 투여된다: KDR의 소분자 억제제, Tie-2의 소분자 억제제; 메토티렉세이트; 프레드니손; 셀레코시브; 폴산; 하이드록시클로로퀸 설페이트; 로페코시브; 에타너셉트; 인플릭시마브; 레플루노미드; 나프록센; 발데코시브; 셀파살라진; 메틸프레드니솔론; 이부프로펜; 멜록시캠; 메틸프레드니솔론 아세테이트; 금 나트륨 티오말레이트; 아스피린; 아자티오프린; 트리암시놀론 아세토니드; 프로포시펜 나프실레이트/apap; 폴레이트; 나부메톤; 디클로페낙; 피록시캠; 에토돌락; 디클로페낙 나트륨; 옥사프로진; 옥시코돈 hcl; 하이드로코돈 비타르테이트/apap; 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨; 펜타닐; 아나킨라, 사람 재조합 트라마돌 hcl; 살살레이트; 설린락; 시아노코발라민/fa/피리독신; 아세트아미노펜; 알렌드로네이트 나트륨; 프레드니솔론; 모르핀 설페이트; 리도카인 하이드로클로라이드; 인도메타신; 글루코사민 설페이트/콘드로이틴; 사이클로스포린; 아미트립틸린 hcl; 셀파디아진; 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜; 울로파타딘 hcl; 미소프로스톨; 나프록센 나트륨; 오메프라졸; 미코페놀레이트 모페틸; 사이클로포스파미드; 리톡시마브; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; 항-IL 18; 항-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; 로플루밀라스트; IC-485; CDC-801; 및 메소프람.

[0363]

본 발명의 결합 단백질이 배합될 수 있는 염증장병에 유용한 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 부데노사이드; 표피 성장 인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린, 셀파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토피린; 아자티오프린; 메트로니다졸; 리톡시게나제 억제제; 메살라민; 올살라진; 발살라지드; 항산화제; 트롬복산 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1β 모노클로날 항체; 항-IL-6 모노클로날 항체; 성장 인자; 엘라스타제 억제제; 피리디닐-이미다졸 화합물; 및 다른 사람 사이토킨 또는 성장 인자, 예컨대 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF 등에 대한 항체 또는 길항제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포 표면 분자, 예컨대 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69 및 CD90, 및 이들의 리간드에 대한 항체와 조합될 수도 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 제제, 예컨대 메토티렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예컨대 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, TNF α 또는 IL-1과 같은 전염증성 사이토킨

에 의한 시그널 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 $\beta$  전환효소 억제제, TNF  $\alpha$  전환효소 억제제, T-세포 시그널 전달 억제제, 예컨대 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 용해성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체(예, 용해성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, 및 sIL-6R) 및 소염성 사이토킨(예, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF $\beta$ ) 및 bcl-2 억제제와 배합될 수 있다.

[0364]

결합 단백질이 배합될 수 있는 크론병 치료제의 바람직한 예에는 다음과 같은 것이 있다: TNF 길항제, 예컨대 항-TNF 항체, 아달리무마브(PCT 공개 WO 97/29131; HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP 571, TNFR-Ig 작제물, (p75TNFR1gG(ENBREL) 또는 p55TNFR1gG(LENERCEPT)) 억제제 및 PDE4 억제제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 코르티코스테로이드, 예컨대 부테노사이드 및 텍사메타손과 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 또한 설과살라진, 5-아미노살리실산 및 올살라진과 같은 제제, 및 전염증성 사이토킨, 예컨대 IL-1, 예를 들어 IL-1 $\beta$  전환효소 억제제 및 IL-1ra의 합성 또는 작용을 방해하는 제제와 배합될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 T 세포 시그널 전달 억제제, 예컨대 타이로신 키나제 억제제 6-머캅토피린과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 IL-11과 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 메살라민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토피린, 인플릭시마브, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트로프 설페이트, 로피아미드 하이드로클로라이드, 메토티렉세이트, 오메프라졸, 폴레이트, 시프로플록사신/텍스트로스-물, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오시노나이드, 메트로니다졸, 티메로살/붕산, 콜레스티라민/슈크로스, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 하이드로코돈 설페이트, 메페리딘 하이드로클로라이드, 미다졸람 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 인산나트륨, 설과메톡사졸/트리메토프림, 셀레코시브, 폴리카르보필, 프로록시펜 나프틸레이트, 하이드로코르티손, 멀티비타민, 발살라지드 이나트륨, 코데인 포스페이트/apap, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 엽산, 레보플록사신, 메틸프레드니솔론, 나탈리주마브 및 인터페론-감마와 배합될 수 있다.

[0365]

본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 다발성 경화증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 코르티코스테로이드; 프레드니솔론; 메틸프레드니솔론; 아자티오프린; 사이클로포스파미드; 사이클로스포린; 메토티렉세이트; 4-아미노피리딘; 티자나딘; 인터페론- $\beta$  1a(AVONEX; Biogen); 인터페론- $\beta$  1b(BETASERON; Chiron/Berlex); 인터페론  $\alpha$ -n3(Interferon Sciences/Fujimoto), 인터페론- $\alpha$  (Alfa Wassermann/J&J), 인터페론  $\beta$  1A-IF(Serono/Inhale Therapeutics), 페그인터페론  $\alpha$  2b(Enzon/Schering-Plough), 코폴리머 1(Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 고압 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 다른 사람 사이토킨 또는 성장인자 및 이의 수용체, 예컨대 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF에 대한 항체 또는 길항제. 본 발명의 결합 단백질은 CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90과 같은 세포 표면 분자 또는 이의 리간드에 대한 항체와 조합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 제제, 예컨대 메토티렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예컨대 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, TNF  $\alpha$  또는 IL-1과 같은 전염증성 사이토킨에 의한 시그널 전달을 방해하는 제제(예, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 $\beta$  전환효소 억제제, TACE 억제제, T-세포 시그널 전달 억제제, 예컨대 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 용해성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체(예, 용해성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, 및 sIL-6R) 및 소염성 사이토킨(예, IL-4, IL-10, IL-13 및 TGF $\beta$ ) 및 bcl-2 억제제와 배합될 수 있다.

[0366]

본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 다발성 경화증 치료제의 바람직한 예에는 인터페론  $\beta$ , 예컨대 IFN $\beta$  1a 및 IFN $\beta$  1b; 코팍손, 코르티코스테로이드, 카스파제 억제제, 예컨대 카스파제-1 억제제, IL-1 억제제, TNF 억제제 및 CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체가 포함된다.

[0367]

본 발명의 결합 단백질은 또한 제제, 예컨대 알람투주마브, 드로나비롤, 유니메드, 다클리주마브, 미토크산트론, 크살리 프로텐 하이드로클로라이드, 팜프리딘, 글라티라머 아세테이트, 나탈리주마브, 신나비돌,  $\alpha$ -임퓨노진 NNS03, ABR-215062, AnergiX.MS, 케목진 수용체 길항제, BBR-2778, 칼라구알린, CPI-1189, LEM(리포좀 캡슐화된 미토크산트론), THC.CBD(칸나비노이드 효능제) MBP-8798, 메소프람(PDE4 억제제), MNA-715, 항-IL-6 수용체 항체, 뉴로박스, 피르페니돈, 알로트랩 1258(RDP-1258), sTNF-R1, 탈람파넬, 테리플루노마이드, TGF-베타2, 티플리모타이드, VLA-4 길항제(예컨대, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), 인터페론 감마 길항제, 및 IL-4 효능제와 배합될 수 있다.

[0368]

본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 협심증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 아스피린,

니트로글리세린, 이소소르비드 모노니트레이트, 메토프롤롤 석시네이트, 아테놀로, 메토프롤롤 타르트레이트, 암로디핀 베실레이트, 딜티아젠펜 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 클로피도그렐 비설페이트, 니페디핀, 이토바스타틴 칼슘, 염화칼륨, 후로세미드, 심바스타틴, 베라파밀 hcl, 디곡신, 프로프라놀롤, 하이드로클로라이드, 카베딜롤, 리시노프릴, 스피로노락톤, 하이드로클로로티아지드, 에나라프릴 말레이트, 나돌로, 라미프릴, 에녹사파린 나트륨, 헤라핀 나트륨, 발사르탄, 소탈롤 하이드로클로라이드, 페노피브레이트, 에제티미브, 부메타니드, 로사탄 포타슘, 리시노프릴/하이드로클로로티아지드, 펠로디핀, 캅토프릴, 및 비소프롤롤 푸마레이트.

[0369] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 강직 척추염 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 이브푸로펜, 디클로페낙 및 미소프로스톨, 나프록센, 멜록시캄, 인도메타신, 디클로페낙, 셀레콕시브, 로페콕시브, 설파살라진, 메토타렉세이트, 아자티오프린, 미노시클린, 프레드니손, 에타너셉트, 및 인플릭시마브.

[0370] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 천식 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 알부테롤, 살메테롤/플루티카손, 몬테루카스트 나트륨, 플루티카손 프로피오네이트, 부테소니드, 프레드니손, 살메테롤 크시나포에이트, 레발부테롤 hcl, 알부테롤 설페이트/이프라트로프, 프레드니솔론 나트륨 포스페이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 베클로메타손 디프로피오네이트, 이프라트로프 브로마이드, 아지트로마이신, 피르부테롤 아세테이트, 프레드니솔론, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 클라리트로마이신, 자피르루카스트, 포르모테롤 푸마레이트, 인플루엔자 바이러스 백신, 메틸프레드니솔론, 아목시실린 트리하이드레이트, 플루니솔라이드, 알레르기 주사, 크로몰린 나트륨, 펙소페나딘 하이드로클로라이드, 플루니솔라이드/멘톨, 아목시실린/클라불라네이트, 레보플록사신, 흡입기 보조 장치, 구아이페네신, 텍사메타손 나트륨 포스페이트, 목시플록사신 hcl, 독시사이클린 하이드레이트, 구아이페네신/d-메토판, p-에페드린/cod/클로페니르, 가티플록사신, 세테리진 하이드로클로라이드, 모메타손 푸로에이트, 살메테롤 신나포에이트, 벤조나테이트, 세팔렉신, pe/하이드로코돈/클로르페니르, 세티리진 hcl/슈도에페드, 페닐에프린/cod/프로메타진, 코데인/프로메타진, 세프프로질, 텍사메타손, 구아이페네신/슈도에페드린, 클로페니라민/하이드로코돈, 네도크로밀 나트륨, 테르부탈린 설페이트, 에피네프린, 메틸프레드니솔론, 및 메타프로테레놀 설페이트.

[0371] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 COPD 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 알부테롤 설페이트/이프라트로프, 이프라트로프 브로마이드, 살메테롤/플루티카손, 알부테롤, 살메테롤 크시나포에이트, 플루티카손 프로피오네이트, 프레드니손, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 몬테루카스트 나트륨, 부테소니드, 포르모테롤 푸마레이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 레보플록사신, 구아이페네신, 아지트로마이신, 베클로메타손 디프로피오네이트, 레발부테롤 hcl, 플루니솔라이드, 세프트리악손 나트륨, 아목시실린 트리하이드레이트, 가티플록사신, 자피르루카스트, 아목시실린/클라불라네이트, 플루니솔라이드/멘톨, 클로르페니라민/하이드로코돈, 메타프로테레놀 설페이트, p-데페드린/로라타딘, 테르부탈린 설페이트, 티오토로프 브로마이드, (R,R)-포르모테롤, TgAAT, 실로밀라스트, 및 로플루밀라스트.

[0372] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 HCV 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 인터페론-알파-2a, 인터페론-알파-2b, 인터페론-알파 con1, 인터페론-알파-n1, 폐결화된 인터페론-알파-2a, 폐결화된 인터페론-알파-2b, 리바비린, 페그인터페론 알파-2b + 리바비린, 우르소데옥시콜린산, 글리시리진산, 티말파신, 막사민, VX-497 및 표적, 즉 HCV 폴리머라제, HCV 프로테아제, HCV 헬리카제, 및 HCV IRES(내부 리보솜 진입 부위)의 간섭을 통해 HCV를 치료하는데 사용되는 임의의 화합물.

[0373] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 특발폐섬유증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 프레드니손, 아자티오프린, 알부테롤, 콜히친, 알부테롤 설페이트, 디곡신, 감마 인터페론, 메틸프레드니솔론 sod succ. 로라제팜, 후로세미드, 리시노프릴, 니트로글리세린, 스피로놀락톤, 시클로포스파미드, 이프라트로프 브로마이드, 악티노마이신 d, 알테플라스, 플루티카손 프로피오네이트, 레보플록사신, 메타프로테레놀 설페이트, 몰핀 설페이트, 옥시코돈 hcl, 염화칼륨, 트리암시놀론 아세토나이드, 무수 테크로리무스, 칼슘, 인터페론- $\alpha$ , 메토타렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 및 인터페론-감마-1 $\beta$ .

[0374] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 심근경색 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 아스피린, 니트로글리세린, 메토프롤롤 타르트레이트, 에녹사파린 나트륨, 헤라핀 나트륨, 클로피도그렐 비설페이트, 카베딜롤, 아테놀롤, 몰핀 설페이트, 메토프롤롤 석시네이트, 워파린 나트륨, 리시노프릴, 이소소르비드 모노니트레이트, 디곡신, 후로세미드, 심바스타틴, 라미프릴, 테넥테플라스, 에나라프릴 말레이트, 토르세미드, 레타바스, 로사탄 포타슘, 퀴나프릴 hcl/mag carb, 부메타니드, 알테플라스, 아날라프릴라트, 아미오다론 하이드로클로라이드, 티로피반 hcl m-하이드레이트, 딜티아젠펜 하이드로클로라이드, 캅토프릴, 이르베사탄, 발사탄,

프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 호시노프릴 나트륨, 리도카인 하이드로클로라이드, 엠티피바타이드, 세파졸린 나트륨, 아트로핀 설페이트, 아미노카프론산, 스피로노락톤, 인터페론, 소탈롤 하이드로클로라이드, 염화칼륨, 도큐세이트 나트륨, 도부타민 hcl, 알프라졸람, 프라바스타틴 나트륨, 아토바스타틴 칼슘, 미다졸람 염산염, 메페리딘 하이드로클로라이드, 이소소르비드 디니트레이트, 에피네프린, 도파민 하이드로클로라이드, 비파리루딘, 로수바스타틴, 엑제티미브/심바스타틴, 아바시미브, 및 카리포르라이드.

[0375] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 건선 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: KDR의 소분자 억제제, Tie-2의 소분자 억제제, 칼시포트리엔, 클로베타솔 프로피오네이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 할로베타솔 프로피오네이트, 타자로텐, 메토타렉세이트, 플루오시노나이드, 베타메타손 diprop 보강형, 플루오시놀론 아세토나이드, 아시트레틴, 타르 샴푸, 베타메타손 발레레이트, 모메타손 후로에이트, 케토코나졸, 프라모신/플루오시놀론, 하이드로코르티손 발레레이트, 플루안드레놀라이드, 우레아, 베타메타손, 클로베타솔 프로피오네이트/에몰, 플루티카손 프로피오네이트, 아지트로마이신, 하이드로코르티손, 보습 포몰라, 엽산, 테소니드, 피메크로리무스, 콜타르, 디플로라손 디아세테이트, 에타너셉트 폴레이트, 젖산, 메톡살렌, hc/비스무스 subgal/znox/resor, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 전스크린, 할시노나이드, 살리실산, 안트라린, 클로코르톨론 피발레이트, 석탄 추출물, 콜타르/살리실산, 콜타르/살리실산/황, 데속시메타손, 디아제팜, 피부연화제, 플루오시노나이드/피부연화제, 광유/피마자유/na lact, 광유/땅콩유, 석유/이소프로필 미리스테이트, 프소칼렌, 살리실산, 비누/트리브롬살란, 티메로살/붕산, 셀레코시브, 인플릭시마브, 사이클로스포린, 알레파셉트, 에팔리주마브, 태크로리무스, 피메크로리무스, PUVA, UVB, 및 설파살라진.

[0376] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 건선 관절염 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 메토타렉세이트, 에타너셉트, 로페코시브, 셀레코시브, 엽산, 설파살라진, 나프록센, 레플루노미드, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 인도메타신, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 프레드니손, 설린당, 베타메타손 diprop 보강형, 인플릭시마브, 메토타렉세이트, 폴레이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 디클로페낙, 디메틸설펜사이드, 피록시캄, 디클로페낙 나트륨, 케토프로펜, 멜록시캄, 메틸프레드니솔론, 나부메톤, 톨메틴 나트륨, 칼시포트리엔, 사이클로스포린, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 플루오시노나이드, 글루코사민 설페이트, 골드 나트륨 티오말레이트, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 이부프로펜, 리세드로네이트 나트륨, 설파디아진, 티오구아닌, 발데코시브, 알레파셉트, 에팔리주마브 및 bc1-2 억제제.

[0377] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 재협착증 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 시로리무스, 파클리탁셀, 에버로리무스, 타크로리무스, 조타롤리무스, 및 아세타미노펜.

[0378] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 좌골신경통 치료제의 비제한적 예에는 다음과 같은 것이 있다: 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 로페코시브, 시클로벤자프린 hcl, 메틸프레드니솔론, 나프록센, 이부프로펜, 옥시코돈 hcl/아세타미노펜, 셀렉코시브, 발데코시브, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 코데인 포스페이트/apap, 트라마돌 hcl/아세타미노펜, 메타사론, 멜록시캄, 메도카르바몰, 리도카인 하이드로클로라, 디플로페낙 나트륨, 가바펜틴, 텍사메타손, 카리소프로돌, 케톨락 트로메타민, 인도메타신, 아세타미노펜, 디아제팜, 나부메톤, 옥시코돈 hcl, 티자니딘 hcl, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 프로폭시펜 냐실레이트/apap, asa/oxyd/옥시코돈 ter, 이부프로펜/하이드로코돈 bit, 트라마돌 hcl, 에토돌락, 프로폭시펜 hcl, 아미트립틸린 hcl, 카리소프로돌/코데인 phos/asa, 몰핀 설페이트, 멀티비타민, 나프록센 나트륨, 오르페나드린 시트레이트, 및 테마제팜.

[0379] 본 발명의 결합 단백질과 배합될 수 있는 SLE(루푸스) 치료제의 바람직한 예에는 다음과 같은 것이 있다: NSAID, 예컨대 디클로페낙, 나프록센, 이부프로펜, 피록시캄, 인도메타신; COX2 억제제, 예컨대 셀레코시브, 로페코시브, 발데코시브; 항말라리아제, 예컨대 하이드록시클로로퀸; 스테로이드, 예컨대 프레드니손, 프레드니솔론, 부데노사이드, 텍사메타손; 세포독성제, 예컨대 아자티오프린, 시클로포스파미드, 미코페놀레이트 모페틸, 메토타렉세이트; 및 PDE4 억제제 또는 퓨린 합성 억제제, 예컨대 셀레셉트. 본 발명의 결합 단백질은 또한 설파살라진, 5-아미노살리실산, 올살라진, 이류란 및 IL-1과 같은 전염증성 사이토킨의 합성, 생산 또는 작용을 방해하는 제제, 예컨대 IL-1 $\beta$  전환효소 억제제 및 IL-1ra와 같은 카스파제 억제제와 배합될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 T 세포 시그널 전달 억제제, 예컨대 티로신 키나제 억제제; 또는 T 세포 활성화 분자를 표적으로 하는 분자, 예컨대 CTLA-4-IgG 또는 항-B7계 항체, 및 항-PD-1계 항체 등과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 IL-11 또는 항사이토킨 항체, 예컨대 포노토리주마브(항-IFN $\gamma$  항체) 또는 항수용체 항체, 예컨대 항-IL-6 수용체 항체 및 B-세포 표면 분자에 대한 항체와 조합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 LJP 394(아베티무스), B-세포를 불활성화시키거나 고갈시키는 제제, 예컨대 리툭시마브(항-CD20 항체), 림포스타트-B(항-BlyS 항체), TNF 길항제, 예컨대 항-TNF 항체, D2E7(PCT 공개 WO 97/29131;

HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP571, TNFR-Ig 작제물(P75TNFRIG(ENBREL) 및 p55TNFRIG(LENERCEPT)) 및 bcl-2 억제제와 함께 사용될 수 있는데 그 이유는 유전자전이 마우스에서 bcl-2 과발현이 낭창과 같은 표현형을 유발하는 것으로 입증되었고(문헌참조: Marquina, R. et al. (2004) J. Immunol. 172(11): 7177-7185) 따라서 이의 억제제가 치료학적 효과를 가질 것으로 예상되기 때문이다.

[0380] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질의 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"이란 용어는 원하는 치료 결과를 수득하기 위한 투여량과 필요 기간 동안의 유효한 양을 의미한다. 상기 항체 또는 항체 일부의 치료학적 유효량은 당업자라면 결정할 수 있는 것으로서, 질병 상태, 연령, 성별 및 개체의 체중과 개체 내에서 원하는 반응을 유도해내는 항체 또는 항체 일부의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료학적 유효량은 치료학적 유익 효과가 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해 효과를 능가하는 양이다. "예방학적 유효량"은 원하는 예방학적 결과를 수득하기 위한 투여량 및 필요 기간 동안의 유효한 양을 의미한다. 일반적으로, 예방학적 용량은 질병의 초기 단계전이나 초기 단계에 피검체에 사용되기 때문에 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적은 양일 것이다.

[0381] 투여 계획은 원하는 최적 반응(예컨대, 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 1회의 일시주사를 투여할 수도 있고, 여러 분할 용량을 경시적으로 투여할 수도 있으며 또는 치료 상황의 위급성에 따라 비례하여 감소 또는 증가된 용량을 투여할 수도 있다. 특히, 투여 용이성과 투여량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 조제하는 것이 유리하다. 본 명세서에 사용된 투여 단위 형태는 치료하는 포유동물 피검체에 대하여 단일 투여량으로서 적당한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다. 따라서, 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 제공하도록 계산된 소정 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 세부사항은 (a) 활성 화합물의 독특한 특징 및 수득하고자 하는 특정 치료 또는 예방학적 효과, 및 (b) 개체의 민감도 치료에 있어서 상기 활성 화합물을 배합하는 기술 고유의 제한에 따라 결정되고 직접 좌우된다.

[0382] 본 발명의 결합 단백질의 치료학적 또는 예방학적 유효량에 대한 비제한의 예시적 범위는 0.1 내지 20mg/kg, 더 바람직하게는 1 내지 10mg/kg 이다. 용량 값이 완화될 병태의 유형 및 중증도에 따라 다양할 수 있음을 주지해야 한다. 또한, 투여량 값은 개체의 필요 및 조성물 투여를 관리하거나 감독하는 자의 전문가적 판단에 따라 경시적으로 조정되어야 하며, 본 명세서에 제시된 투여량 범위는 예시적일 뿐이며 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하고자 하는 것이 아님을 명심해야 한다.

[0383] 본원에 기재된 발명의 방법이 기타 적합하게 변형되고 적용될 수 있고 본 발명의 범위 또는 본원에 기재된 양태로부터 벗어나지 않고서도 적합한 등가물을 사용하여 변형되고 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다. 현재 본 발명을 상세하게 설명했고 이와 동일하게 하기의 실시예를 참조로 보다 명백하게 이해될 수 있을 것이고 당해 실시예는 설명을 목적으로 포함된 것이지 본 발명을 제한하고자 한 것은 아니다.

[0384] V. 진단

[0385] 본원에 기재된 내용은 또한 진단 적용을 제공한다. 이것은 하기에서 추가로 설명된다.

[0386] I. 분석 방법

[0387] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 DVD-Ig를 사용하여 시험 샘플에서 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법을 제공한다. 당업계에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 분석이 당해 방법에 사용될 수 있다. 이의 예는 면역분석, 예를 들어, 샌드위치 면역분석(예를 들어, 모노클로날, 폴리클로날 및/또는 DVD-Ig 샌드위치 면역분석 또는 이의 임의의 변형(예를 들어, 모노클로날/DVD-Ig, DVD-Ig/폴리클로날 등)을 포함하지만 이에 제한되지 않고 방사성동위원소 검출(방사성면역분석(RIA)) 및 효소 검출(효소 면역분석(EIA) 또는 효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA)(예를 들어, Quantikine ELISA 분석, R&D Systems, Minneapolis, MN)), 경쟁 억제 면역분석(예를 들어, 정배향 및 역배향), 형광 편광 면역분석(FPIA), 효소 다중 면역분석 기술(EMIT), 생발광 공명 에너지 전달(BRET), 및 균일한 화학발광 분석 등을 포함한다. SELDI 기본 면역분석에서, 목적하는 분석물(이의 단편)에 특이적으로 결합하는 포획 시약은 질량 분광측정 프로브, 예를 들어, 예비활성화된 단백질 칩 어레이에 부착된다. 당해 분석물(또는 이의 단편)은 이어서 바이오칩상에 특이적으로 포획되고 포획된 분석물(또는 이의 단편)은 질량 분광측정에 의해 검출된다. 또는 분석물(또는 이의 단편)은 포획 시약으로부터 용출되고 통상의 MALDI (매트릭스 원소 레이저 탈착/이온화 또는 SELDI에 의해 검출된다. 화학발광 나노입자 면역분석, 특히, ARCHITECT®

자동화 분석기(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)를 사용하는 면역분석은 바람직한 면역분석의 한 예이

다.

[0388] 뇨, 혈액, 혈청 및 혈장 및 기타 체액을 수거하고, 취급하고 프로세싱하기 위해 당업계에 널리 공지된 방법이 본 발명의 수행을 위해 사용되고, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 DVD-Ig가 면역진단 시약으로서 및/또는 분석물 면역분석 키트에서 사용되는 경우이다. 시험 샘플은 목적하는 분석물에 추가로 항체, 항원, 합텐, 호르몬, 약물, 효소, 수용체, 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 당해 샘플은 피험체로부터 수득되는 전혈 샘플일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 면역 분석 전에 시험 샘플, 특히, 전혈을 전처리 시약으로 처리될 필요가 있거나 요망될 수 있다. 전처리가 필요하지 않은 경우라도(예를 들어, 대부분 뇨 샘플), 전처리가 임의로 수행될 수 있다(예를 들어, 상업적 플랫폼상의 계획의 일부로서).

[0389] 전처리 시약은 본 발명의 면역분석 및 키트와 함께 사용하기에 적당한 임의의 시약일 수 있다. 전처리는 임의로 다음을 포함한다: (a) 하나 이상의 용매(예를 들면, 메탄올 및 에틸렌 글리콜) 및 임의로 염, (b) 하나 이상의 용매 및 염, 및 임의로 세제, (c) 세제, 또는 (d) 세제 및 염. 전처리 시약은 당업계에 공지되어 있고 이러한 전처리는 예를 들어, 문헌[참조: 예를 들어, Yatscoff et al. (1990) Clin. Chem. 36: 1969-1973, 및 Wallemacq et al. (1999) Clin. Chem. 45: 432-435]에 기재된 바와 같은 Abbott TDx, AxSYM<sup>®</sup>

, 및 ARCHITECT<sup>®</sup>

분석기(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), 및/또는 상업적으로 시판되는 것으로서 사용될 수 있다. 추가로 전처리는 문헌[참조: 미국 특허 제5,135,875호, 유럽 특허 공개 제 EU0471293, 미국 특허 제 6,660,843호 및 미국 특허 출원 제 20080020401호]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 전처리 시약은 이중성 제제 또는 동중성 제제일 수 있다.

[0390] 이중성 전처리 시약의 사용으로, 전처리 시약은 샘플에 존재하는 분석물 결합 단백질(예를 들어, 분석물 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질)을 침전시킨다. 당해 전처리 단계는 샘플에 전처리 제제의 첨가로 형성된 혼합물의 상등액을 침전된 분석물 결합 단백질로부터 분리함에 의해 임의의 분석물 결합 단백질을 제거함을 포함한다. 당해 분석에서, 임의의 결합 단백질이 부재인 혼합물의 상등액이 당해 분석에 사용되고 직접 항체 포획 단계로 진행한다.

[0391] 동종의 전처리 시약의 사용시에는 당해 분리 단계가 없다. 시험 샘플 및 전처리 시약의 전체 혼합물을 표지된 항-분석물 항체(또는 항원적으로 반응성인 이의 단편)와 같은 분석물(또는 이의 단편)에 대해 표지된 특이적 결합 파트너와 접촉시킨다. 당해 분석을 위해 사용되는 전처리 시약은 제1 특이적 결합 파트너에 의한 포획 전 또는 포획 동안에 전처리된 시험 샘플 혼합물중에 희석시킨다. 당해 희석에도 불구하고, 특정 양의 전처리 시약은 포획동안에 시험 샘플 혼합물중에 존재(또는 잔류)한다. 본 발명에 따라, 표지된 특이적 결합 파트너는 DVD-Ig (또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)일 수 있다.

[0392] 이중성 포맷에서, 시험 샘플이 피험체로부터 수득된 후 제1 혼합물을 제조한다. 당해 혼합물은 분석물(또는 이의 단편)에 대해 평가된 시험 샘플 및 제1 특이적 결합 파트너를 포함하고, 여기서, 제1 특이적 결합 파트너 및 시험 샘플중에 함유된 임의의 샘플은 제1 특이적 결합 파트너-분석물 복합체를 형성한다. 바람직하게, 제1 특이적 결합 파트너는 항-분석물 항체 또는 이의 단편이다. 제1 특이적 결합 파트너는 본원에 기재된 바와 같은 DVD-Ig (또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편). 혼합물을 형성하기 위해 시험 샘플 및 기타 특이적 결합 파트너가 첨가되는 순서는 중요하지 않다. 바람직하게, 제1 특이적 결합 파트너는 고형상에 고정화된다. 면역분석(제1 특이적 결합 파트너 및 임의로 제2 특이적 결합 파트너에 대해)에 사용되는 고형상은 자기 입자, 비드, 시험 튜브, 미세적정 플레이트, 큐벳, 막, 스캐폴딩 분자, 필름, 여과지, 디스크 및 칩(이에 제한되지 않음)과 같은 당업계에 공지된 임의의 고형상일 수 있다.

[0393] 제1 특이적 결합 파트너-분석물 복합체를 함유하는 혼합물이 형성된 후, 임의의 결합되지 않은 분석물이 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 복합체로부터 제거된다. 예를 들면, 비결합된 분석물은 세척에 의해 제거될 수 있다. 바람직하게, 그러나, 제1 특이적 결합 파트너는 시험 샘플중에 존재하는 임의의 분석물을 초과하여 존재하여 시험 샘플중에 존재하는 모든 분석물은 제1 특이적 결합 파트너에 의해 결합되어 있다.

[0394] 임의의 비결합된 분석물이 제거된 후, 제1 특이적 결합 파트너는 제1 특이적 결합 파트너-분석물-제2 특이적 결합 파트너 복합체를 형성하기 위해 혼합물에 첨가된다. 제2 특이적 결합 파트너는 바람직하게 제1 특이적 결합 파트너에 의해 결합된 분석물상의 에피토프와는 상이한 분석물상의 에피토프에 결합하는 항-분석물 항체이다.

더욱이, 또는 바람직하게, 제2 특이적 결합 파트너는 상기된 바와 같은 검출가능한 표지로 표지되거나 이를 포함한다. 제2 특이적 결합 파트너는 본원에 기재된 바와 같은 DVD-Ig (또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)일 수 있다.

[0395] 당업계에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 검출가능한 표지가 사용될 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 표지는 방사성활성 표지(예를 들어,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ , 및  $^{33}\text{P}$ ), 효소적 표지(예를 들어, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 퍼옥시다제, 글루코스 6-포스페이트 데하이드로게나제 등), 화학발광 표지(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 티오에스테르, 또는 설펜아미드; 루미놀, 이소루미놀, 펜안트리디늄 에스테르 등), 형광 표지(예를 들어, 플루오레세인(예를 들어, 5-플루오레세인, 6-카복시플루오레세인, 3'6-카복시플루오레세인, 5(6)-카복시플루오레세인, 6-헥사클로로-플루오레세인, 6-테트라클로로플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 등)), 로다민, 물리화학적 단백질, R-피치코에리트린, 쿠안텀 도트(예를 들어, 황화아연-캡핑된 셀렌화카드뮴), 온도측정 표지, 또는 면역-폴리머라제 연쇄 반응 표지일 수 있다. 표지로의 도입, 표지 과정 및 표지 검출은 문헌[참조: Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), and in Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996)(조합된 핸드북 및 문헌(참조: Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon에 의해 공개된 카탈로그))]에서 밝혀졌다. 형광 표지는 FPIA(문헌 참조: 미국 특허 제5,593,896호, 제5,573,904호, 제5,496,925호, 제5,359,093호, 및 제5,352,803호)에 사용될 수 있다. 아크리디늄 화합물은 동중 또는 이중 화학발광 분석중에 검출가능한 표지로서 사용될 수 있다(문헌 참조: Adamczyk et al. (2006) Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 1324-1328; Adamczyk et al. (2004) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 2313-2317; Adamczyk et al. (2004) Biorg. Med. Chem. Lett. 14: 3917-3921; 및 Adamczyk et al. (2003) Org. Lett. 5: 3779-3782).

[0396] 바람직한 아크리디늄 화합물은 아크리디늄-9-카복사미드이다. 아크리디늄 9-카복사미드를 제조하는 방법은 문헌[참조: Mattingly (1991) J. Biolumin. Chemilumin. 6: 107-114; Adamczyk et al. (1998) J. Org. Chem. 63: 5636-5639; Adamczyk et al. (1999) Tetrahedron 55: 10899-10914; Adamczyk et al. (1999) Org. Lett. 1: 779-781; Adamczyk et al. (2000) Biocon. Chem. 11: 714-724; Mattingly et al. In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk et al. (2003) Org. Lett. 5: 3779-3782; 및 미국 특허 제5,468,646호, 제5,543,524호 및 제5,783,699호]에 기재되어 있다. 또 다른 바람직한 아크리디늄 화합물은 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르이다. 아크리디늄-9-카복실레이트 에스테르의 예는 10-메틸-9-(페녹시카보닐)아크리디늄 플루오로설포네이트(제조원(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)으로부터 시판됨)이다. 아크리디늄 9-카복실레이트 아릴 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조: McCapra et al. (1965) Photochem. Photobiol. 4: 1111-21; Razavi et al. (2000) Luminescence 15: 245-249; Razavi et al. (2000) Luminescence 15: 239-244; 및 미국 특허 제5,241,070호]에 기재되어 있다. 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르 및 이의 용도에 관한 추가의 세부사항은 미국 특허 공개 제20080248493호에 기재되어 있다.

[0397] 화학발광 분석(상기된 바와 같은 아크리디늄 또는 다른 화학발광제를 사용하는)은 문헌[참조: Adamczyk et al. (2006) Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67]에 기재된 방법에 따라 수행할 수 있다. 임의의 적합한 분석 포맷이 사용될 수 있지만, 미세플레이트 화학발광측정기(Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN)로 신속하게 소량의 다발성 샘플 분석을 수행할 수 있다.

[0398] 시험 샘플 및 특이적 결합 파트너가 화학발광 분석용 혼합물을 형성하기 위해 첨가되는 순서는 중요하지 않다. 제1 특이적 결합 파트너가 화학발광제(예를 들어, 아크리디늄 화합물)로 표지되는 경우, 검출가능하게 표지된 제1 특이적 결합 파트너-분석물 복합체가 형성된다. 또한, 제2 특이적 결합 파트너가 사용되고 제2 특이적 결합 파트너가 아크리디늄 화합물과 같은 화학발광제로 검출가능하게 표지되는 경우, 검출가능하게 표지된 제1 특이적 결합 분석물 제2 비특이적 결합 파트너 복합체가 형성된다. 임의의 비결합된 특이적 결합 파트너는 표지된 또는 비표지된 것에 상관없이 세척과 같은 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 혼합물로부터 제거될 수 있다.

[0399] 과산화수소는 혼합물중에서 동일계에서 생성될 수 있거나 상기된 아크리디늄 화합물 첨가 전, 이와 동시에 또는 이후에 혼합물에 제공되거나 공급될 수 있다(예를 들어, 과산화수소의 공급원은 과산화수소를 함유하는 것으로 공지된 하나 이상의 완충액 또는 기타 용액이다). 과산화수소는 당업자에게 자명한 바와 같은 다수의 방식으로 동일계에서 생성될 수 있다.

[0400] 샘플에 하나 이상의 염기성 용액의 동시 또는 후속적 첨가시, 검출가능한 시그널, 즉, 화학발광 시그널(분석물

의 존재를 지적함)이 생성된다. 염기성 용액은 10 이상, 바람직하게는 12 이상의 pH를 갖는다. 염기성 용액의 예는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 수산화암모늄, 수산화마그네슘, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 수산화칼슘, 탄산칼슘, 및 중탄산칼슘을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 샘플에 첨가된 염기성 용액의 양은 염기성 용액의 농도에 의존한다. 사용되는 염기성 용액의 농도를 기준으로, 당업자는 샘플에 첨가하기 위한 염기성 용액의 양을 용이하게 결정할 수 있다.

[0401] 생성된 화학발광 시그날은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 생성된 시그날 강도를 기준으로, 샘플중의 분석물의 양은 정량될 수 있다. 구체적으로, 샘플중의 분석물의 양은 생성된 시그날의 강도에 비례한다. 존재하는 분석물의 양은 분석물에 대한 표준 곡선에 대해 생성된 빛의 양을 비교하거나 참조 표준 물질과 비교하여 정량할 수 있다. 표준 곡선은 질량 분광측정, 중력측정 방법 및 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 공지된 농도의 분석물의 연속 희석액 또는 용액을 사용하여 생성될 수 있다. 화학발광제로서 아크리디늄 화합물의 사용에 대한 강조와 함께 기재되지만 당업자는 기타 화학발광제의 사용을 위해 당해 기재내용을 용이하게 적용할 수 있다.

[0402] 분석물 면역분석은 일반적으로 샌드위치 포맷(이에 제한되지 않음)과 같은 당업계에 공지된 임의의 포맷을 사용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 하나의 면역분석 포맷에서, 2개 이상의 항체를 사용하여 샘플중의 사람 분석물 또는 이의 단편과 같은 분석물을 분리하고 정량한다. 보다 구체적으로, 2개 이상의 항체는 "샌드위치"로서 언급되는 면역 복합체를 형성하는 분석물(또는 이의 단편)상에 상이한 에피토프에 결합한다. 일반적으로, 면역분석에서, 하나 이상의 항체(이들 항체는 "포획" 항체 또는 "포획" 항체들로서 흔히 언급된다)를 사용하여 시험 샘플중에 분석물(또는 이의 단편)을 포획하고 하나 이상의 항체를 사용하여 샌드위치에 검출가능한(즉, 정량가능한) 표지를 결합시킬 수 있다(이들 항체는 흔히 "검출 항체", "검출 항체들", "접합체" 또는 "접합체들"로서 언급된다). 따라서, 샌드위치 면역분석 포맷과 관련하여, 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질 또는 DVD-Ig (또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)를 포획 항체, 검출 항체 또는 둘다로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 분석물(또는 이의 단편)상에 제1 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 하나의 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 포획제로서 사용될 수 있고/있거나 분석물(또는 이의 단편)상에 제2 에피토프와 결합할 수 있는 도메인을 갖는 또 다른 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 검출제로서 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 분석물(이의 단편)상에 제1 에피토프와 결합할 수 있는 제1 도메인 및 분석물(또는 이의 단편)상에 제2 에피토프와 결합할 수 있는 제2 도메인을 갖는 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 포획제 및/또는 검출제로서 사용될 수 있다. 또한, 제1 분석물(또는 이의 단편)상에 에피토프를 결합할 수 있는 제1 도메인 및 제2 분석물(또는 이의 단편)상에 에피토프와 결합할 수 있는 제2 도메인을 갖는 하나의 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 2개 이상의 분석물을 검출하고 임의로 정량하기 위해 포획제 및/또는 검출제로서 사용될 수 있다. 분석물이 동중성 또는 이종성일 수 있는 단량체 형태 및 이량체/다량체 형태와 같은 1개 이상의 형태로 샘플중에 존재할 수 있는 경우에, 단량체 형태상에서만 노출된 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 하나의 결합 단백질 또는 DVD-Ig 및 이량체/다량체 형태의 상이한 부분상의 에피토프와 결합할 수 있는 도메인을 갖는 또 다른 결합 단백질 또는 DVD-Ig는 포획제 및/또는 검출제로서 사용되어 검출을 가능하게 하고 상이한 형태의 소정의 분석물을 정량할 수 있게 한다. 추가로, 단일 결합 단백질 또는 DVD-Ig내 및/또는 결합 단백질 또는 DVD-Ig 사이에 차등적 친화성을 갖는 결합 단백질 또는 DVD-Ig를 사용하여 결합이 있음을 제공할 수 있다. 본원에 기재된 면역분석과 관련하여, 이것은 일반적으로 결합 단백질 또는 DVD-Ig의 구조물내 하나 이상의 링커를 혼입시키기 위해 도움을 줄 수 있거나 요망될 수 있다. 존재하는 경우, 최적으로 링커는 외곽 도메인에 의한 또 다른 에피토프의 결합 뿐만 아니라 내부 도메인에 의한 에피토프의 결합을 가능하게 하기 위해 충분한 길이 및 구조적 실행가능성을 가져야만 한다. 이와 관련하여, 결합 단백질 또는 DVD-Ig가 2개의 상이한 분석물과 결합할 수 있고 하나의 분석물이 또 다른 분석물보다 큰 경우, 바람직하게 대형 분석물은 외곽 도메인에 의해 결합된다.

[0403] 일반적으로 말해서, 분석물(또는 이의 단편)에 대해(함유된 것으로 의심되는) 시험된 샘플은 동시에 또는 후속적으로 및 임의의 순서로 하나 이상의 포획제(또는 포획체들) 및 하나 이상의 검출제(이것은 제2 검출제 또는 제3 검출제일 수 있거나 심지어 연속적으로 번호를 매긴 검출제, 예를 들어, 경우에 따라 포획제 및/또는 검출제가 다중 체제를 포함한다)와 접촉시킬 수 있다. 예를 들어, 시험 샘플은 먼저 하나 이상의 포획제와 접촉시킴에 이어서 연속적으로 하나 이상의 검출제와 접촉시킬 수 있다. 또한 시험 샘플은 먼저 하나 이상의 검출제와 접촉시키고 이어서 (연속적으로) 하나 이상의 포획제와 접촉시킬 수 있다. 또 다른 양태에서, 시험 샘플은 포획제 및 검출제와 동시에 접촉시킬 수 있다.

[0404] 샌드위치 분석 포맷에서, 분석물(또는 이의 단편)을 함유하는 의심되는 샘플은 먼저 제1 체제/분석물 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 제1 포획제와 접촉시킨다. 하나 이상의 포획제가 사용되는 경우, 2개

이상의 포획제를 포함하는 제1 포획제/분석물 복합체가 형성된다. 샌드위치 분석에서, 당해 제제, 즉, 바람직하게 하나 이상의 포획제가 시험 샘플에서 예상되는 물 과량의 최대량의 분석물(또는 이의 단편)에 사용된다. 예를 들어, 완충액(예를 들어, 미세입자 피복 완충액) ml당 약 5  $\mu$ g 내지 약 1 mg의 제제가 사용될 수 있다.

[0405]

단지 하나의 항체(즉, 본 발명과 관련하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig)에 의한 결합이 요구되기 때문에 작은 분석물을 측정하기 위해 흔히 사용되는 경쟁 억제 면역분석은 연속적 및 통상적 포맷을 포함한다. 연속적 경쟁 억제 면역분석에서, 목적하는 분석물에 대한 포획제를 미세적정 플레이트 또는 기타 고체 지지체의 웰상으로 피복시킨다. 목적하는 분석물을 함유하는 샘플이 웰에 첨가되는 경우, 목적하는 분석물은 포획제에 결합한다. 세척 후, 포획 항체에 결합할 수 있는 표지된 양의 표지된(예를 들어, 비오틴 또는 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)) 분석물을 당해 웰에 첨가한다. 효소적 표지에 대한 기질은 시그날을 생성할 필요가 있다. HRP를 위해 적합한 기질의 예는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)이다. 세척 후, 표지된 분석물에 의해 생성된 시그날은 측정하고 샘플중의 분석물의 양과 반비례한다. 통상적인 경쟁 억제 면역분석에서, 목적하는 분석물에 대한 항체(즉, 본 발명과 관련하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig)는 전형적으로 고형상 지지체(예를 들어, 미세역가 플레이트의 웰)상으로 피복시킨다. 그러나, 연속적인 경쟁 억제 면역분석 같지 않게 당해 샘플 및 표지된 분석물은 동시에 웰에 첨가한다. 샘플 중의 임의의 분석물은 포획제에 결합하는 것에 대해 표지된 분석물과 경쟁한다. 세척 후, 표지된 분석물에 의해 생성된 시그날을 측정하고 샘플중의 분석물의 양에 반비례한다. 물론, 이들 포맷에는 다수의 변형이 존재하고 - 예를 들면, 고체 기질에 결합하는 경우 포맷은 1단계, 2단계, 지연된 2단계 등이고- 이들은 당업자 중 하나에게 인식될 것이다.

[0406]

임의로, 시험 샘플을 하나 이상의 포획제(예를 들어, 제1 포획제)와 접촉시키기 전에, 하나 이상의 포획제를, 시험 샘플로부터 제1 제제/분석물(또는 이의 단편) 복합체의 분리를 촉진시키는 고형 지지체상에 결합시킬 수 있다. 포획제가 결합된 기질은 샘플로부터 포획제-분석물 복합체의 분리를 촉진시키는 임의의 적합한 고형 지지체 또는 고형상일 수 있다.

[0407]

이의 예는 미세적정 플레이트와 같은 플레이트의 웰, 시험 튜브, 다공성 겔(예를 들어, 실리카 겔, 아가로스, 텍스트란, 또는 젤라틴), 중합체 필름(예를 들어, 폴리아크릴아미드), 비드(예를 들어, 폴리스티렌 비드 또는 자기 비드), 여과기/막(예를 들어, 니트로셀룰로스 또는 나일론) 스트립, 미세입자(예를 들어, 라텍스 입자, 자기화될 수 있는 미세입자(예를 들어, 산화철 또는 산화크로뮴 및 동종 또는 이종 중합체 피복물을 갖고 반경이 약 1 내지 10 $\mu$ m)를 포함한다. 당해 기질은 항원과 결합하기에 적합한 표면 친화성 및 검출 항체에 의한 접근을 허용하기에 충분한 다공성을 갖는 적합한 다공성 물질을 포함할 수 있다. 수화된 상태의 젤라틴성 물질이 사용될 수 있지만 미세다공성 물질이 일반적으로 바람직하다. 당해 다공성 기질은 바람직하게 두께가 약 0.01 내지 약 0.5mm, 바람직하게는 약 0.1mm인 쉬트 형태이다. 공극 크기는 상당히 다양할 수 있지만 바람직하게 공극 크기는 약 0.025에서 약 15 $\mu$ m이고 보다 바람직하게는 약 0.15에서 약 15 $\mu$ m이다. 당해 기질의 표면은 항체의 기질로의 공유 결합을 유발하는 화학적 공정에 의해 수동적으로 피복되거나 또는 활성화될 수 있다. 일반적으로 항원 또는 항체의 기질로의 소수성 힘을 통한 흡착에 의한 비가역적 결합이 생성된다. 또한, 화학적 커플링 제제 또는 기타 다른 수단을 사용하여 항체를 기질로 공유결합시킬 수 있고 단, 당해 결합은 분석물에 결합하는 항체의 능력을 방해하지 않는다. 또는, 당해 항체(즉, 본 발명과 관련하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig)는 사전에 스트렙타비딘 (예를 들어, DYNAL®

Magnetic Beads, Invitrogen, Carlsbad, CA) 또는 비오틴으로 피복된 미세입자(예를 들어, Power-Bind™-SAM-MP 스트렙타비딘 피복된 미세입자(Seradyn, Indianapolis, IN)) 또는 항-중-특이적 모노클로날 항체(즉, 본 발명과 관련하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig)와 결합될 수 있다. 필요하다거나 소망되는 경우, 당해 기질(예를 들면 표지용)은 항체(즉, 본 발명과 관련하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig) 상의 다양한 기능성 그룹과의 반응을 허용하기 위해 유도체화될 수 있다. 당해 유도체화는 특정 커플링제의 사용을 요구하고 이의 예는 말레산 무수물, N-하이드록시숙신이미드, 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 경우에 따라, 하나 이상의 포획제, 예를 들어, 항체(또는 이의 단편)(즉, 본 발명과 관련하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig)를 포함하지만 이에 제한되지 않고 분석물에 특이적인 이의 각각은 상이한 물리적 또는 허용가능한 위치(예를 들어, 바이오칩 배위(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,225,047호; PCT 공보 No. WO 99/51773; 미국 특허 제6,329,209호; PCT 공보 No. WO 00/56934, 및 미국 특허 No. 5,242,828)]에서 고형상에 부착될 수 있다. 포획제가 고형 지지체로서 질량 분광측정 프로브에 부착되는 경우, 당해 프로브에 결합된 분석물의 양은 레이저 탈착 이온화 질량 분광측정에 의해 검출될 수 있다. 또는, 단일 칼럼은 상이한 비드로 팩킹될 수 있고 당해 비드는 하나 이상의 포획제로 유도체화되어 단일 위치에서 분석물을 포획한다(참조: 항체 유도체화된 비드 기본 기술, 예를 들어, 루미넥스 xMAP 기술(Austin, TX)).

- [0408] 분석물(또는 이의 단편)에 대해 분석된 시험 샘플을 하나 이상의 포획제(예를 들어, 제1 포획제)와 접촉시킨 후, 당해 혼합물을, 제1 포획제(또는 다중 포획제)-분석물(이의 단편) 복합체가 형성되도록 항온처리한다. 항온 처리는 약 2℃ 내지 약 45℃의 온도에서 약 4.5 내지 약 10.0의 pH에서 적어도 약 1분 내지 약 18시간, 바람직 하게는 약 1 내지 약 24분, 가장 바람직하게는 약 4 내지 약 18분동안 수행될 수 있다. 본원에 기재된 면역분석 은 1단계(샘플, 하나 이상의 포획제 및 하나 이상의 검출제가 모두 연속적으로 또는 동시에 반응 용기에 첨가됨 을 의미하는) 또는 1개 이상의 단계, 예를 들어, 1단계 이상, 예를 들어, 2단계, 3단계 등으로 수행할 수 있다.
- [0409] (제1 또는 다중) 포획제/분석물(또는 이의 단편) 복합체의 형성 후, 당해 복합체를 이어서 (제1 또는 다중) 포 획제/분석물(또는 이의 단편)/제2 검출제 복합체)의 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 검출제와 접촉시 킨다. 명백하기 위해 "제2" 제제로서(예를 들어, 제2 검출제) 포획되지만, 사실 다중 제제가 포획 및/또는 검출 을 위해 사용되는 경우, 하나 이상의 검출제가 면역분석에서 사용되는 제2, 제3, 제4 제제 등일 수 있다. 포획 제/분석물(또는 이의 단편) 복합체가 하나 이상의 검출제와 접촉되는 경우, (제1 또는 다중) 포획제/분석물(또 는 이의 단편)/(다중) 검출제 복합체가 형성된다. 포획제(예를 들어, 제1 포획제)에 대하여, 하나 이상의 (예를 들어, 제2 및 임의의 연속) 검출제가 포획제/분석물(또는 이의 단편) 복합체와 접촉되는 경우 상기된 것들과 유 사한 조건하에서 항온 처리가 (제1 또는 다중) 포획제/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다중) 검출제 복합체 의 형성을 위해 요구된다. 바람직하게, 하나 이상의 검출제는 검출 가능한 표지를 포함한다. 검출가능한 표지는 (제1 또는 다중) 포획제/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다중) 포획제/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다 중) 검출제 복합체의 형성 전, 이와 동시에 이후에 하나 이상의 검출제(예를 들어, 제2 검출제)에 결합될 수 있 다. 당업계에 공지된 임의의 검출 가능한 표지가 사용될 수 있다(상기 논의를 참조: the Polak and Van Noorden (1997) and Haugland (1996)).
- [0410] 검출가능한 표지는 제제에 직접적으로 또는 커플링제를 통해 결합될 수 있다. 사용될 수 있는 커플링제의 예는 EDAC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드, 하이드로클로라이드)(제조원: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)이다. 사용될 수 있는 다른 커플링 제제는 당업계에 공지되어 있다. 항체에 검출가능한 표지를 결합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 추가로, 많은 검출가능한 표지는 구입될 수 있거나 합성될 수 있고 당해 표지 는 제제로의 검출 가능한 표지의 커플링을 촉진시키는 목적 그룹을 이미 함유하고 있고 예를 들어, CPSP-아크리 디늄 에스테르(즉, 9-[N-토실-N-(3-카복시프로필)]-10-(3-설포프로필)아크리디늄 카복사미드) 또는 SPSP-아크 리디늄 에스테르(즉, N10-(3-설포프로필)-N-(3-설포프로필)-아크리디늄-9-카복사미드)가 있다.
- [0411] (제1 또는 다중) 포획제/분석물/(제2 또는 다중) 검출제 복합체는 표지의 정량 전에 시험 샘플의 나머지로부터 분리될 수 있거나 분리될 필요가 없다. 예를 들어, 하나 이상의 포획제(예를 들어, 제1 포획제, 본 발명과 관련 하여 결합 단백질 및/또는 DVD-Ig 등)가 웰 또는 비드와 같은 고정 지지체에 결합되는 경우, 분리는 고정 지지 체와의 접촉으로부터 유체(시험 샘플의 유체)를 제거함에 의해 달성될 수 있다. 또는, 적어도 제1 포획제가 고 형 지지체에 결합되는 경우, 이것은 분석물-함유 샘플 및 하나 이상의 제2 검출제와 동시에 접촉시켜 제1(다중) 제제/분석물/제2 (다중) 제제 복합체를 형성할 수 있고 이어서 당해 고정 지지체와의 접촉으로부터 유체(시험 샘플)을 제거한다. 적어도 제1 포획제가 고정 지지체에 결합되지 않은 경우(제1 또는 다중) 포획제/분석물/(제2 또는 다중) 검출제 복합체는 표지 양의 정량을 위해 시험 샘플로부터 제거될 필요는 없다.
- [0412] 표지된 포획제/분석물/검출제 복합체(예를 들어, 제1 포획제/분석물/제2 검출제 복합체)의 형성 후, 복합체내 표지의 양은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 정량한다. 예를 들어, 효소적 표지가 사용되는 경우, 표지된 복 합체는 발색과 같이 반응이 정량가능할 수 있는 표지에 대한 기질과 반응시킨다. 표지가 방사성활성 표지인 경 우, 당해 표지는 섬광 계수기와 같은 적당한 수단을 사용하여 정량한다. 표지가 형광 표지인 경우, 당해 표지는 한 색상의 빛("여기 파장"으로서 공지됨)으로 표지를 자극시키고 자극에 반응하여 표지에 의해 방출되는 또 다 른 색상("방출 파장"으로서 공지됨)을 검출함에 의해 정량한다. 표지가 화학발광 표지인 경우, 당해 표지는 가 시적으로 또는 발광측정기, X-선 필름, 고속 사진 필름, CCD 필름 등을 사용함에 의해 방출되는 빛을 검출함에 의해 정량된다. 일단 복합체내 표지의 양이 정량된 경우 시험 샘플중의 분석물 또는 이의 단편의 농도는 적당한 수단, 예를 들어, 공지된 농도의 분석물 또는 이의 단편의 연속 희석을 사용하여 생성된 표준 곡선을 사용함에 의해 결정한다. 분석물 또는 이의 단편의 연속 희석을 사용하는 것 외에 표준 곡선은 질량 분광측정 및 다른 당 업계에 공지된 기술에 의한 중력측정으로 생성될 수 있다.
- [0413] ARCHITECT®
- 분석기를 사용하는 화학발광 미세입자 분석에서, 집합체 희석 pH는 약 6.0 +/- 0.2이어야만 하고, 미세입자 피 복 완충액은 약 실온(즉, 약 17 내지 약 27℃에서)에서 유지되어야만 하고, 미세입자 피복 완충액 pH는 약 6.5

+/- 0.2이어야만 하고, 미세입자 회석 pH는 약 7.8 +/- 0.2이어야만 한다. 고체는 바람직하게 약 0.2% 미만, 예를 들어, 0.15% 미만, 약 0.14% 미만, 약 0.13% 미만, 약 0.12% 미만, 또는 약 0.11% 미만, 예를 들어, 약 0.10%이다.

[0414] FPIA는 경쟁 결합 면역분석 원리를 기초로 한다. 형광 표지된 화합물이 선형 편광 빛에 의해 여기되는 경우 이의 회전율에 역비례하는 편광 정도를 갖는 형광을 방출한다. 형광 표지된 추적-항체 복합체가 서형 편광된 빛에 의해 여기되는 경우, 방출된 빛은 형광단위, 빛이 흡수되고 방출되는 시간 사이에 회전하는 것으로 제약을 받기 때문에 고도로 편광된 상태로 있다. "자유" 추적 화합물(즉, 항체에 결합되지 않은 화합물)이 선형 편광 빛에 의해 여기되는 경우, 이의 회전은 경쟁 결합 면역분석에서 생성되는 상응하는 추적-항체 접합체(또는 본 발명에 따른 추적-결합 단백질 및/또는 추적-DVD-Ig) 보다 훨씬 신속하다. FPIA는 특별한 취급 및 처리를 요하는 방사성활성 물질이 없기 때문에 RIA 보다 잇점을 갖는다. 또한, FPIA는 용이하게 및 신속하게 수행될 수 있는 균일한 분석이다.

[0415] 상기 관점에서, 시험 샘플중에 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 (i) (i') 분석물에 결합할 수 있는 항체 또는 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편 및 분석물에 결합할 수 있는 본원에 기재된 결합 단백질 및 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 이의 변이체의 단편) 및 (ii') 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고 (ii) 대조군 또는 계측기내 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직간접적인 징후로서 생성된 시그널과, 시험 샘플중의 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직간접적인 징후로서 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그널을 비교함을 포함하는 분석에 의해 분석물(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 분석함을 포함한다. 계측기는 임의로 일련의 계측기의 일부이고 여기서, 계측기 각각은 분석물의 농도에 의해 다른 계측기로부터 상이하다.

[0416] 당해 방법은 (i) 분석물에 결합할 수 있는 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편 및 분석물에 결합할 수 있는 본원에 기재된 결합 단백질 및 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 이의 변이체의 단편)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너를 시험 샘플과 접촉시켜 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)을 형성하는 단계, (ii) 분석물에 결합할 수 있는 검출가능하게 표지된 항-분석물 항체 또는 검출가능하게 표지된 항-분석물 항체의 단편, 분석물과 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 검출가능하게 표지된 변이체, 분석물과 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 변이체의 검출가능하게 표지된 단편, 분석물과 결합할 수 있는 검출가능하게 표지된 본원에 기재된 결합 단백질, 및 검출가능하게 표지된 DVD-Ig(또는 단편, 변이체, 이의 변이체의 단편)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너와 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체를 접촉시켜 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)/제2 특이적 결합 파트너 복합체를 형성하는 단계 및 (iii) (ii)에서 형성된 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)/제2 특이적 결합 파트너 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그널을 검출하거나 측정함에 의해 시험 샘플내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함한다. 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너 및/또는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너가 본원에 기재된 결합 단백질 또는 본원에 기재된 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)인 방법이 바람직할 수 있다.

[0417] 또는, 당해 방법은 분석물에 결합할 수 있는 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편, 본원에 기재된 결합 단백질, 및 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 분석물(또는 이의 단편)에 대한 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너와 시험 샘플을 접촉시키는 단계 및 동시에 또는 연속으로 어느 한 순서로 하나 이상의 제1 특이적 결합 파트너에 결합하는 것에 대해 분석물(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있고, 제1 특이적 결합 파트너에 결합할 수 있는 검출가능하게 표지된 분석물, 검출가능하게 표지된 분석물의 단편, 제1 특이적 결합 파트너와 결합할 수 있는 분석물의 검출가능하게 표지된 변이체, 제1 특이적 결합 파트너와 결합할 수 있는 분석물의 변이체의 검출가능하게 표지된 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너와 시험 샘플을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 시험 샘플에 존재하는 임의의 분석물(또는 이의 단편) 및 하나 이상의 제2 특이적 결합 파트너는 서로 경쟁하여 각각 제1 특이적 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체 및 제1 특이적 결합 파트너/제2 특이적 결합 파트너 복합체를 형성한다. 당해 방법은 추가로 (ii)에서 형성된 제1 특이적 결합 파트너/제2 특이적 결합 파트너 복합체중에서 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그널을 검출하거나 측정함에 의해 시험 샘플내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 단계를 포함하고, 이때, 제1 특이적 결합 파트너

/제2 특이적 결합 파트너 복합체내 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그날은 시험 샘플중에 분석물의 양 또는 농도에 반비례한다.

[0418] 상기 방법은 추가로 시험 샘플이 수득된 환자의 치료학적/예방학적 치료의 효능을 진단하거나, 예후하거나 평가함을 포함할 수 있다. 당해 방법이 추가로 시험 샘플이 수득된 환자의 치료학적/예방학적 치료의 효능을 평가하는 단계를 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 효능을 개선시킬 필요가 있는 환자의 치료학적/예방학적 치료를 변형시키는 단계를 추가로 포함한다. 당해 방법은 자동화 시스템 또는 반자동화 시스템에서 사용하기 위해 채택될 수 있다.

[0419] 보다 특정적으로는, 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법이 제공된다. 이 방법은 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)에 대해 면역검정에 의해 검정하는 것을 포함한다. 면역검정은 (i) 하나 이상의 결합 단백질과 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생하는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생한 신호와 비교하는 것을 포함한다. 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 (또는 이의 단편)의 농도가 시리즈 중의 다른 계측기와 상이한 계측기 시리즈의 일부이다. 하나 이상의 결합 단백질중 하나는 (i')  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고;  $VD2$ 는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며;  $C$ 는 중쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우  $CH1$ 이 아니며;  $(X2)_n$ 은  $Fc$  영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드쇄를 포함하고 (ii') 한 쌍의 항원과 결합할 수 있다. 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 형성하고, (ii) 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성하고, (iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생한 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 결합 단백질이다. 다른 방안으로서, 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)과 접촉시키고 (이에 따라, 시험 시료중에 존재하는 항원 (또는 이의 단편)과 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (이의 단편) 복합체를 각각 형성한다) (ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생한 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)에서 검출가능한 표지에 의해 발생한 신호는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 양 또는 농도와 반비례한다. 시험 시료는 환자로부터 채취된 것일 수 있으며, 이 경우에 당해 방법은 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함할 수 있다. 만일 당해 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 추가로 효능의 개선을 위해 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 당해 방법은 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용할 수 있도록 적용될 수 있다.

[0420] 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 다른 방법이 제공된다. 당해 방법은 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)에 대해 면역검정에 의해 검정하는 것을 포함한다. 면역검정은 (i) 하나 이상의 결합 단백질과 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생하는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생한 신호와 비교하는 것을 포함한다. 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 (또는 이의 단편)의 농도가 시리즈 중의 다른 계측기와 상이한 계측기 시리즈의 일부이다. 하나 이상의 결합 단백질중 하나는 (i')  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고;  $VD2$ 는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며;  $C$ 는 경쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우  $CH1$ 이 아니며;  $(X2)_n$ 은  $Fc$  영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드쇄를 포함하고 (ii') 한 쌍의 항원과 결합할 수 있다. 당해 방법은

(i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 형성하고, (ii) 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성하고, (iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 결합 단백질이다. 다른 방안으로서, 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)과 접촉시키고 (이에 따라, 시험 시료중에 존재하는 항원 (또는 이의 단편)과 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (이의 단편) 복합체를 각각 형성한다) (ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 결합 단백질이고 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 양 또는 농도와 반비례한다. 만일 시험 시료가 환자로부터 채취된 것인 경우, 당해 방법은 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함할 수 있다. 만일 당해 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 추가로 효능의 개선을 위해 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 당해 방법은 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용할 수 있도록 적용될 수 있다.

[0421]

시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 또 다른 방법이 제공된다. 당해 방법은 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)에 대해 면역검정에 의해 검정하는 것을 포함한다. 면역검정은 (i) 하나 이상의 결합 단백질과 하나 이상의 검출가능한 표지를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생하는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생한 신호와 비교하는 것을 포함한다. 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 (또는 이의 단편)의 농도가 시리즈 중의 다른 계측기와 상이한 계측기의 일부이다. 하나 이상의 결합 단백질중 하나는 (i') 제1  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고;  $VD2$ 는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며;  $C$ 는 중쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우  $CH1$ 이 아니며;  $(X2)_n$ 은  $Fc$  영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제1 폴리펩타이드 쇄 및 제2  $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$  [여기서,  $VD1$ 은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고;  $VD2$ 는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며;  $C$ 는 경쇄 불변 도메인이고;  $(X1)_n$ 은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우  $CH1$ 이 아니며;  $(X2)_n$ 은  $Fc$  영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, (ii') 한 쌍의 항원과 결합할 수 있다. 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 형성하고, (ii) 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성하고, (iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 결합 단백질이다. 다른 방안으로서, 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)과 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)과 접촉시키고 (이에 따라, 시험 시료중에 존재하는 항원 (또는 이의 단편)과 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (이의 단편) 복합체를 각각 형성한다) (ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포

획제는 하나 이상의 결합 단백질이고 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 양 또는 농도와 반비례한다. 만일 시험 시료가 환자로부터 채취된 것인 경우, 당해 방법은 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함할 수 있다. 만일 당해 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 추가로 효능의 개선을 위해 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 당해 방법은 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용할 수 있도록 적용될 수 있다.

[0422]

시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 또 다른 방법이 제공된다. 당해 방법은 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)에 대해 면역검정에 의해 검정하는 것을 포함한다. 면역검정은 (i) 두 개의 항원과 하나 이상의 검출가능한 표지와 결합할 수 있는 하나 이상의 DVD-Ig를 사용하고, (ii) 검출가능한 표지에 의해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생하는 신호를 대조군 또는 계측기에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 발생된 신호와 비교하는 것을 포함한다. 계측기는 임의로 각 계측기의 항원 (또는 이의 단편)의 농도가 시리즈 중의 다른 계측기와 상이한 계측기 시리즈의 일부이다. 하나 이상의 DVD-Ig중 하나는 (i') 4개의 폴리펩타이드 쇠 (여기서, 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇠는 제1 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함하고, 제3 및 제4 폴리펩타이드 쇠는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한다)를 포함하고, (ii') 두 개의 항원(또는 이의 단편)과 결합할 수 있다. 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 포획제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 형성하고, (ii) 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체를 검출가능한 표지를 포함하고 포획제에 의해 결합되지 않은 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 검출제 하나 이상과 접촉시켜 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체를 형성하고, (iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 포획제/항원 (또는 이의 단편)/검출제 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료에서 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제 및/또는 하나 이상의 검출제는 하나 이상의 DVD-Ig이다. 다른 방안으로서, 당해 방법은 (i) 시험 시료를 항원 (또는 이의 단편)의 에피토프와 결합하는 하나 이상의 포획제와 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체가 형성되도록 접촉시키고, 동시에 또는 순서에 상관 없이 순차적으로, 시험 시료를 하나 이상의 포획제와의 결합에 대해 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)과 접촉시키고 (이에 따라, 시험 시료중에 존재하는 항원 (또는 이의 단편)과 검출가능하게 표지된 항원은 서로 경쟁하여 포획제/항원 (또는 이의 단편) 복합체 및 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편) 복합체를 각각 형성한다) (ii) 상기 단계 (i)에서 형성된 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편) 복합체에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호를 근거로 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 하나 이상의 포획제는 하나 이상의 DVD-Ig이고 포획제/검출가능하게 표지된 항원 (또는 이의 단편)에서 검출가능한 표지에 의해 발생된 신호는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)의 양 또는 농도와 반비례한다. 만일 시험 시료가 환자로부터 채취된 것인 경우, 당해 방법은 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 진단, 예후 또는 평가하는 것을 포함할 수 있다. 만일 당해 방법이 추가로 환자의 치료/예방 요법의 효능을 평가하는 것을 포함하는 경우, 당해 방법은 임의로 추가로 효능의 개선을 위한 필요에 따라 환자의 치료/예방 요법을 변형시키는 것을 포함할 수 있다. 당해 방법은 자동 시스템 또는 반자동 시스템에 사용할 수 있도록 적용될 수 있다.

[0423]

분석 방법(및 이에 대한 키트)과 관련하여 상업적으로 시판되는 항-분석물 항체 또는 문헌에 기재된 바와 같은 항 분석물의 제조 방법을 사용할 수 있다. 다양한 항체의 공급원은 다음을 포함한다: Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), Gen Way Biotech, Inc. (San Diego, CA), 및 R&D Systems (RDS; Minneapolis, MN).

[0424]

일반적으로, 미리 결정된 수준은 분석물 또는 이의 단편에 대한 시험 샘플을 분석시, 예를 들어, 질환 또는 질환의 위험을 검출하기 위해 수득된 결과를 평가하기 위한 벤치마크로서 사용될 수 있다. 일반적으로, 비교를 하는데 있어서, 미리 결정된 수준은 질환, 장애 또는 병태의 특정 단계 및 중점 또는 특정 임상적 지점과 관련하여 분석물 존재, 양 또는 농도의 연계 또는 연합이 만들어 질수 있도록 충분한 횟수 및 적당한 조건하에서 특정 분석을 수행함에 의해 수득된다. 전형적으로 미리 결정된 수준은 참조 피험체(또는 피험체 집단)의 분석과

함께 수득된다. 측정된 분석물은 이의 단편, 이의 분해 생성물 및/또는 이의 효소적 절단 생성물을 포함할 수 있다.

[0425] 특히, 질환 진행 및/또는 치료를 모니터링하기 위해 사용되는 바와 같은 미리 결정된 수준과 관련하여, 분석물 또는 이의 단편의 양 또는 농도는 "비변화", "선호적으로" (또는 "선호적으로 변형된") 또는 "비선호적으로"(또는 "비선호적으로 변형된")일 수 있다. "상승된" 또는 "증가된"은 전형적인 또는 정상의 수준 또는 범위(예를 들어, 미리 결정된 수준) 보다 높은 또는 또 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들어, 보다 조기에 또는 기본 샘플) 보다 높은 시험 샘플내 양 또는 농도를 언급한다. 용어 "저하된" 또는 "감소된"은 전형적이거나 정상의 수준 또는 범위(예를 들어, 미리결정된 수준)보다 낮거나 또 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들어, 초기 또는 기본 샘플) 보다 낮은, 시험 샘플내 양 또는 농도를 언급한다. 용어 "변화된"은 전형적이거나 정상의 수준 또는 범위 (예를 들어, 미리 결정된 수준) 또는 또 다른 표준 수준 또는 범위(예를 들어, 초기 또는 기본 샘플)에 비해 변화된 샘플내 양 또는 농도를 언급한다.

[0426] 분석물에 대해 전형적이거나 정상의 수준 또는 범위는 표준 관행에 따라 정의된다. 몇몇 경우에 분석물 수준은 매우 낮기 때문에, 소위 변화된 수준 또는 변화는 실험적 오차 또는 샘플 변화에 의해 설명될 수 없는 전형적이거나 정상적인 수준 또는 범위 또는 표준 수준 또는 범위와 비교하여 임의의 총 변화가 있는 경우 발생한 것으로 고려될 수 있다. 따라서, 특정 샘플에서 측정된 수준은 소위 정상의 피험체로부터 유사한 샘플내에서 결정된 수준 또는 수준 범위와 비교한다. 이와 관련하여, "정상의 피험체"는 예를 들어, 어떠한 감지할만한 질환이 없는 개체이고 "정상"(때때로, "대조군"으로서 언급됨) 환자 또는 집단은 예를 들어, 각각 검출가능한 질환을 나타내지 않는 환자 또는 집단이다. 추가로, 분석물이 대부분의 사람 집단에서 고준에서 통상적으로 발견되지 않는 경우, "정상의 피험체"는 어떠한 실질적인 검출가능한 증가되거나 상승된 양 또는 농도의 분석물이 없는 피험체로서 고려될 수 있고 "정상" (때때로 "대조군"으로서 언급됨) 환자 또는 집단은 어떠한 실질적으로 검출가능한 증가되거나 상승된 양 또는 농도의 분석물을 나타내지 않는 환자 또는 집단이다. "명백하게 정상인 피험체"는 분석물이 아직 존재하지 않거나 현재 존재하지 않는 것으로 평가된 피험체이다. 분석물 수준은 분석물이 정상적으로는 검출될 수 없지만(예를 들어, 정상 수준은 제로이거나 정상 집단의 약 25 내지 약 75%의 범위내에 있다) 시험 샘플에서는 검출되는 경우 및 분석물이 정상 수준 보다 높은 수준으로 시험 샘플에 존재하는 경우인 경우 "상승된" 것으로 말한다. 따라서, 특히, 당해 기재내용은 특정 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 가질 위험에 처한 환자를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 당해 분석 방법은 또한 다른 마커 등의 분석을 포함할 수 있다.

[0427] 따라서, 본원에 기재된 방법은 또한 피험체가 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 가질 위험에 처해 있는지를 결정하는데 사용될 수 있다. 구체적으로 당해 방법은:

[0428] (a) 분석물(또는 이의 단편)의 피험체로부터 시험 샘플내 농도 또는 양을 결정하는 단계(본원에 기재된 방법 또는 당업계에 공지된 방법을 사용하여); 및

[0429] (b) 단계(a)에서 결정된 분석물(또는 이의 단편)의 양을, 미리 결정된 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있고, 이때, 단계(a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양이 미리결정된 수준과 관련하여 선호되는 경우 피험체는 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖지 않거나 위험에 처하지 않는 것으로 결정된다. 그러나, 단계 (a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양이 미리 결정된 수준과 비선호되는 경우 피험체는 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 이의 위험에 처한 것으로 결정된다.

[0430] 추가로, 피험체에서 질환의 진행을 모니터링하는 방법이 제공된다. 최적으로 당해 방법은:

[0431] (a) 분석물 피험체로부터 시험 샘플내 농도 또는 양을 측정하는 단계;

[0432] (b) 분석물의 피험체로부터 후반 시험 샘플내 농도 또는 양을 측정하는 단계; 및

[0433] (c) 단계(a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양과 단계 ( b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양을 비교하는 단계를 포함하고 단계 (b)에서 결정된 농도 또는 양이 단계(a)에서 결정된 분석물의 농도 또는 양과 비교하는 경우 변화되지 않거나 비선호성인 경우, 피험체내 질환은 계속되는 진행성 또는 악화된 것으로 결정된다. 비교에 의해, 단계(b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 단계(a)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 선호성인 경우, 피험체내 질환은 중단되거나 퇴행성이거나 개선된 것으로 결정된다.

[0434] 임의로, 당해 방법은 추가로 예를 들어, 미리 결정된 수준과 단계 (b)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양을 비교함을 추가로 포함한다. 추가로, 임의로 당해 방법은 비교시 단계(b)에서 결정된 바와 같은 분석물

의 농도 또는 양이 예를 들어, 미리 결정된 수준과 비교하여 비선호성으로 변화됨을 보여주는 경우 일정 시간동안 피험체를 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료함을 포함한다.

[0435] 여전히 추가로, 당해 방법은 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료받은 환자에서 치료를 모니터링하는데 사용될 수 있다. 구체적으로, 당해 방법은 피험체에 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여하기 전에 피험체로부터 제1 시험 샘플을 제공함을 포함한다. 다음에 분석물의 피험체로부터 제1 시험 샘플에서의 농도 또는 양을 결정한다(예를 들어, 본원에 기재된 방법 또는 당업계에 공지된 방법을 사용한다). 분석물의 농도 또는 양을 결정한 후, 임의로 분석물의 농도 또는 양을 이어서 미리 결정된 수준과 비교한다. 제1 시험 샘플에 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 미리 결정된 수준 보다 낮은 경우, 피험체는 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되지 않는다. 그러나, 분석물의 농도 또는 양이 미리 결정된 수준 보다 높은 경우, 피험체는 일정 시간동안 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료된다. 피험체가 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되는 시간은 당업자에 의해 결정될 수 있다(예를 들어, 시간은 약 7일 내지 약 2년일 수 있고 능히 약 14일 내지 약 1년일 수 있다).

[0436] 하나 이상의 약제학적 조성물을 사용한 치료 과정 동안에, 제2 및 후속 시험 샘플을 이어서 피험체로부터 수득한다. 시험 샘플의 수 및 시험 샘플이 피험체로부터 수득되는 시간은 중요하지 않다. 예를 들어, 제2 시험 샘플은 피험체에 먼저 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여한지 7일 후 제2 시험 샘플이 투여될 수 있고 제3 시험 샘플은 피험체에 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여한지 2주 후 수득될 수 있고, 제4 시험 샘플은 피험체에 먼저 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여한지 3주 후 수득될 수 있고 제5 시험 샘플은 피험체에 먼저 하나 이상의 약제학적 조성물 등을 투여한지 4주 후에 수득될 수 있다.

[0437] 각각 제2 또는 후속 시험 샘플이 피험체로부터 수득된 후, 분석물의 농도 또는 양을 제2 또는 후속 시험 샘플에서 결정된다(예를 들어, 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 방법을 사용한다). 제2 및 후속 샘플 각각에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양은 이어서 제1 시험 샘플(예를 들어, 본래에 임의로 미리 결정된 수준과 비교된 시험 샘플)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양과 비교한다. 단계 (c)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양이 단계(a)에서 결정된 바와 같은 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 선호성인 경우 피험체 내 질환은 중단되거나 퇴행성이거나 개선된 것으로 결정되고 피험체에는 단계 (b)의 하나 이상의 약제학적 조성물이 계속 투여되어야만 한다. 그러나, 단계 (c)에서 결정된 농도 또는 양이 단계 (a)에 결정된 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 변화되지 않은 경우 피험체내 질환은 계속되거나 진행성이거나 악화된 것으로 결정되고 피험체는 단계 (b)에서 피험체에 보다 높은 농도의 약제학적 조성물이 투여되어 치료되어야만 하거나 피험체는 단계 (b)에서 피험체에 투여되는 하나 이상의 약제학적 조성물과는 상이한 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되어야만 한다. 구체적으로, 당해 피험체가 피험체의 분석물 수준을 감소시키거나 저하시키기 위해 사전에 투여받은 하나 이상의 약제학적 조성물과는 상이한 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료될 수 있다.

[0438] 일반적으로, 반복 시험이 수행될 수 있는 분석을 위해(예를 들어, 치료에 대한 질환 진행 및/또는 반응을 모니터링하기 위한), 제2 또는 후속 시험 샘플은 제1 시험 샘플이 피험체로부터 수득된 후 시점에 수득된다. 구체적으로 피험체로부터 제2 시험 샘플은 제1 시험 샘플이 피험체로부터 수득된지 수분, 수시간, 수일 또는 수년 후 수득될 수 있다. 예를 들어, 제2 시험 샘플은 피험체로부터 제1 시험 샘플이 수득된지 약 1분, 약 5 분, 약 10 분, 약 15분, 약 30분, 약 45 분, 약 60 분, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4시간, 약 5 시간, 약 6 시간, 약 7 시간, 약 8시간, 약 9 시간, 약 10 시간, 약 11 시간, 약 12 시간, 약 13 시간, 약 14 시간, 약 15 시간, 약 16 시간, 약 17 시간, 약 18 시간, 약 19 시간, 약 20 시간, 약 21 시간, 약 22 시간, 약 23 시간, 약 24 시간, 약 2일, 약 3일, 약 4 일, 약 5일, 약 6 일, 약 7 일, 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 5 주, 약 6 주, 약 7 주, 약 8 주, 약 9 주, 약 10 주, 약 11 주, 약 12 주, 약 13 주, 약 14 주, 약 15 주, 약 16 주, 약 17 주, 약 18 주, 약 19 주, 약 20 주, 약 21 주, 약 22 주, 약 23 주, 약 24 주, 약 25 주, 약 26 주, 약 27 주, 약 28 주, 약 29 주, 약 30 주, 약 31 주, 약 32 주, 약 33 주, 약 34 주, 약 35 주, 약 36 주, 약 37 주, 약 38 주, 약 39 주, 약 40 주, 약 41 주, 약 42 주, 약 43 주, 약 44 주, 약 45 주, 약 46 주, 약 47 주, 약 48 주, 약 49 주, 약 50 주, 약 51 주, 약 52 주, 약 1.5 년, 약 2 년, 약 2.5 년, 약 3.0 년, 약 3.5 년, 약 4.0 년, 약 4.5 년, 약 5.0 년, 약 5.5. 년, 약 6.0 년, 약 6.5 년, 약 7.0 년, 약 7.5 년, 약 8.0 년, 약 8.5 년, 약 9.0 년, 약 9.5 년 또는 약 10.0 년 후 시점에 피험체로부터 수득될 수 있다.

[0439] 질환 진행을 모니터링하기 위해 사용되는 경우, 상기 분석을 사용하여 급성 병태를 앓는 피험체에서 질환의 진행을 모니터링할 수 있다. 또한 임상적 치료 병태로서 공지된 급성 병태는 예를 들어, 심혈관계 또는 분비계가 관여하는 급성, 생명 위협 질환 또는 기타 위독한 의학적 병태를 언급한다. 전형적으로, 중요한 치료 병태는 병원 기반 세팅(응급실, 중환자실, 외상후 센터 또는 기타 응급 치료 세팅을 포함하지만 이에 제한되지 않는다)에서 급성 의학적 간섭 또는 위생 또는 기타 분야별 의료진에 의한 투여를 요하는 병태를 언급한다. 위독한

치료 병태에 대해 반복 투여는 일반적으로 보다 짧은 시간 프레임내에, 즉, 수분, 수시간 또는 일(예를 들어, 약 1 분, 약 5 분, 약 10 분, 약 15 분, 약 30 분, 약 45 분, 약 60 분, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4 시간, 약 5 시간, 약 6 시간, 약 7 시간, 약 8 시간, 약 9 시간, 약 10 시간, 약 11 시간, 약 12 시간, 약 13 시간, 약 14 시간, 약 15 시간, 약 16 시간, 약 17 시간, 약 18 시간, 약 19 시간, 약 20 시간, 약 21 시간, 약 22 시간, 약 23 시간, 약 24 시간, 약 2 일, 약 3 일, 약 4 일, 약 5 일, 약 6 일 또는 약 7일)에 투여되고 초기 분석은 또한 일반적으로 보다 짧은 시간 프레임내에, 예를 들어, 질환 또는 병태의 발병 약 수분, 수시간 또는 수일에 수행된다.

[0440] 또한 당해 분석을 사용하여 만성 또는 비-급성 병태를 앓는 피험체에서 질환의 진행을 모니터링할 수 있다. 비-위독성 치료 또는 비-급성 병태는 예를 들어, 심혈관계 및/또는 분비계가 관여하는 급성 생명 위협 질환 또는 기타 위독한 의학적 병태 이외의 병태를 언급한다. 전형적으로, 비-급성 병태는 장기 또는 만성적의 지속적인 병태를 포함한다. 비-급성 병태에 대해, 반복 모니터링은 보다 긴 시간 프레임내에, 예를 들어, 수시간, 수일, 수주, 수개월 또는 수년 (예를 들어, 약 1 시간, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4 시간, 약 5 시간, 약 6 시간, 약 7 시간, 약 8 시간, 약 9 시간, 약 10 시간, 약 11 시간, 약 12 시간, 약 13 시간, 약 14 시간, 약 15 시간, 약 16 시간, 약 17 시간, 약 18 시간, 약 19 시간, 약 20 시간, 약 21 시간, 약 22 시간, 약 23 시간, 약 24 시간, 약 2 일, 약 3 일, 약 4 일, 약 5 일, 약 6 일, 약 7 일, 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 5 주, 약 6 주, 약 7 주, 약 8 주, 약 9 주, 약 10 주, 약 11 주, 약 12 주, 약 13 주, 약 14 주, 약 15 주, 약 16 주, 약 17 주, 약 18 주, 약 19 주, 약 20 주, 약 21 주, 약 22 주, 약 23 주, 약 24 주, 약 25 주, 약 26 주, 약 27 주, 약 28 주, 약 29 주, 약 30 주, 약 31 주, 약 32 주, 약 33 주, 약 34 주, 약 35 주, 약 36 주, 약 37 주, 약 38 주, 약 39 주, 약 40 주, 약 41 주, 약 42 주, 약 43 주, 약 44 주, 약 45 주, 약 46 주, 약 47 주, 약 48 주, 약 49 주, 약 50 주, 약 51 주, 약 52 주, 약 1.5 년, 약 2 년, 약 2.5 년, 약 3.0 년, 약 3.5 년, 약 4.0 년, 약 4.5 년, 약 5.0 년, 약 5.5. 년, 약 6.0 년, 약 6.5 년, 약 7.0 년, 약 7.5 년, 약 8.0 년, 약 8.5 년, 약 9.0 년, 약 9.5 년 또는 약 10.0 년)에 수행되고, 초기 분석은 또한 일반적으로 장시간 프레임내에 질환 또는 병태의 발병 약 시간, 수일, 수개월 또는 수년에 수행된다.

[0441] 추가로, 상기 분석은 제1 시험 샘플이 하나의 공급원, 예를 들어, 뇨, 혈청 또는 혈장으로부터 획득되는 피험체로부터 획득된 제1 시험 샘플을 사용하여 수행될 수 있다. 임의로, 상기 분석은 이어서 제2 시험 샘플이 또 다른 공급원으로부터 획득된 피험체로부터 획득된 제2 시험 샘플을 사용하여 반복될 수 있다. 예를 들어, 제1 시험 샘플이 뇨로부터 획득된 경우, 제2 시험 샘플은 혈청 또는 혈장으로부터 획득될 수 있다. 제1 시험 샘플 및 제2 시험 샘플을 사용한 분석으로부터 획득된 결과를 비교할 수 있다. 당해 비교를 사용하여 피험체내 질환 또는 병태의 상태를 평가할 수 있다.

[0442] 더욱이, 본원의 기제는 또한 소정의 질환, 장애 또는 병태를 앓거나 예비 진단된 피험체가 치료로부터 이득을 얻을 것인지를 결정하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본원의 기제는 분석물 기반 진단 방법 및 제품에 관한 것이다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 "피험체내 질환 치료를 모니터링"하는 방법은 또한 추가로 최적으로 치료를 위한 후보물을 선별하거나 동정하는 것을 포함할 수 있다.

[0443] 따라서, 특정 양태에서, 본원의 기제는 또한 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 이의 위험에 처한 피험체가 치료를 위한 후보물인지를 결정하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 피험체는 소정의 질환, 장애 또는 병태의 몇몇 증상을 경험하거나 실제로 소정의 질환, 장애 또는 병태를 갖거나 이의 위험에 처한 것으로 진단되고/되거나 본원에 기재된 바와 같은 분석물 또는 이의 단편의 비선택성 농도 또는 양을 입증하는 피험체이다.

[0444] 당해 방법은 임의로 본원에 기재된 바와 같은 분석을 포함하고 여기서 분석물은 하나 이상의 약제학적 조성물 (예를 들어, 특히 분석물이 관련된 작용 기작과 관련된 약제), 면역억제 치료 또는 면역촉진 치료에 의한 피험체의 치료 전 및 후에 평가되거나 여기서, 분석물은 당해 치료 후 평가되고 분석물의 농도 또는 양은 미리 결정된 수준과 비교한다. 치료 후 관찰되는 분석물의 양의 비선택성 농도는 피험체가 추가로 또는 계속되는 치료를 받는 것으로부터 이득을 받지 못하는 것으로 확인되는 반면, 치료 후 관찰되는 분석물의 선택성 농도 또는 양은 피험체가 추가로 또는 계속되는 치료로부터 이득을 받을 것으로 확인된다. 이러한 확증은 임상적 연구의 관리 및 개선된 환자 치료를 원조한다.

[0445] 본원의 특정 양태는 본원에 논의된 바와 같은 소정의 질환, 장애 또는 병태를 평가하기 위해 사용되는데 유리하지만 당해 분석 및 키트는 기타 질환, 장애 및 병태에서 분석물을 평가하기 위해 사용될 수 있는 것은 말할 필요도 없다. 분석 방법은 또한 기타 마커 등의 분석을 포함할 수 있다.

[0446] 또한 분석 방법을 사용하여 소정의 질환, 장애 또는 병태를 완화시키는 화합물을 동정할 수 있다. 예를 들어,

분석물을 발현하는 세포는 후보 화합물과 접촉시킬 수 있다. 당해 화합물과 접촉된 세포에서 분석물의 발현 수준은 본원에 기재된 분석 방법을 사용하는 대조군 세포의 수준과 비교할 수 있다.

[0447] B. 키트

[0448] 시험 샘플내 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 키트가 또한 제공된다. 당해 키트는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 하나 이상의 성분 및 분석물(또는 이의 단편)에 대해 시험 샘플을 평가하기 위한 지침서를 포함한다. 분석물(또는 이의 단편)에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 하나 이상의 성분은 임의로 고품상에 고정화된 본원에 기재된 결합 단백질 및/또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.

[0449] 당해 키트는 면역분석, 예를 들어, 화학발광 미세입자 면역분석에 의한 분석물에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 하나 이상의 성분 및 면역분석, 예를 들어, 화학발광 나노입자 면역분석에 의한 분석물에 대한 시험 샘플을 평가하기 위한 지침서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 당해 키트는 분석물에 대한 하나 이상의 특이적 결합 파트너, 예를 들어, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 이의 변이체 또는 분석물에 결합할 수 있는 변이체의 단편), 본원에 기재된 결합 단백질 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)을 포함할 수 있고 이중 어느 하나는 검출가능하게 표시될 수 있다. 또한 추가로, 당해 키트는 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물과 결합할 수 있는 단편, 분석물과 결합할 수 있는 변이체 또는 분석물과 결합할 수 있는 변이체의 단편), 본원에 기재된 결합 단백질 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)(이중 하나는 고정 지지체상에 고정화될 수 있다)에 결합하는 것에 대해 시험 샘플내 임의의 분석물과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표시된 분석물(또는 항분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체, 본원에 기재된 결합 단백질 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 단편, 변이체 또는 변이체의 단편))를 포함할 수 있다. 당해 키트는 계측기 또는 대조군, 예를 들어, 분리된 또는 정제된 분석물을 포함할 수 있다. 당해 키트는 분석 및/또는 완충액, 예를 들어, 분석 완충 또는 세척 완충(이중 어느 하나는 농축 용액, 검출가능한 표지(예를 들어, 효소적 표지)용 기질 용액 또는 종료 용액으로서 제공될 수 있다)을 수행하기 위해 하나 이상의 컨테이너(예를 들어, 제1 특이적 결합 파트너로 이미 피복될 수 있는 튜브, 미세적정 플레이트 또는 스트립)를 포함할 수 있다. 바람직하게는 당해 키트는 분석을 수행하기 위해 필요한 모든 성분, 즉, 시약, 표준물, 완충액, 희석제 등을 포함한다. 지침서는 종이 형태 또는 디스크, CD, DVD 등과 같은 컴퓨터 판독할 수 있는 형태일 수 있다.

[0450] 보다 특정적으로는, 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 키트가 제공된다. 당해 키트는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 여기서 성분 하나 이상은 (i') VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고 (ii') 한 쌍의 항원과 결합할 수 있으며, 임의로 검출가능하게 표시되는 결합 단백질을 포함한 조성물 하나 이상을 포함한다.

[0451] 추가로, 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 다른 키트가 제공된다. 당해 키트는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 여기서 성분 하나 이상은 (i') VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고 (ii') 한 쌍의 항원과 결합할 수 있으며, 임의로 검출가능하게 표시되는 결합 단백질을 포함한 조성물 하나 이상을 포함한다.

[0452] 추가로, 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 또 다른 키트가 제공된다. 당해 키트는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 여기서 성분 하나 이상은 (i') 제1 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존

재한다]을 포함한 제1 폴리펩타이드 쇄와 제2 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하고 (ii') 한 쌍의 항원과 결합할 수 있으며, 임의로 검출가능하게 표지되는 결합 단백질을 포함한 조성물 하나 이상을 포함한다.

[0453] 추가로, 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 또 다른 키트가 제공된다. 당해 키트는 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 성분 하나 이상 및 시험 시료중의 항원 (또는 이의 단편)을 검정하기 위한 지침서를 포함하며, 여기서 성분 하나 이상은 (i') 4개의 폴리펩타이드 쇄 (여기서, 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄는 제1 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함하고, 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄는 제2 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제1 모 항체와 동일하거나 상이할 수 있는 제2 모 항체 (또는 이의 항원 결합부)로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고 임의로 존재하며, 존재하는 경우 CH1이 아니며; (X2)n은 Fc 영역이고 임의로 존재한다]을 포함한다)를 포함하고, (ii') 두 개의 항원 (또는 이의 단편)과 결합할 수 있으며, 임의로 검출가능하게 표지되는 DVD-Ig를 포함한 조성물 하나 이상을 포함한다.

[0454] 항-분석물 항체, 본원에 기재된 임의의 결합 단백질, 임의의 항 분석물 DVD-Ig와 같은 임의의 항체, 또는 추적자는 본원에 기재된 바와 같은 검출가능한 표지, 예를 들어, 형광단, 방사성활성 잔기, 효소, 비오틴/아비딘 표지, 발색단, 화학발광 표지 등을 혼입시킬 수 있거나 당해 키트는 검출가능한 표지화를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 항체, 계측기 및/또는 대조군은 별도의 컨테이너에 제공될 수 있거나 적당한 분석 포맷으로, 예를 들어, 미세적정 플레이트내로 제공될 수 있다.

[0455] 임의로, 당해 키트는 품질 대조군 성분(예를 들어, 민감성 패널, 계측기 및 양성 대조군)을 포함한다. 품질 대조군 시약의 제법은 당업계에 널리 공지되어 있고 다양한 면역진단 제품에 대한 삽입 스위트상에 기재된다. 민감성 패널 구성원은 임의로 분석 수행능 특성을 확립하기 위해 사용되고 임의로 추가로 면역분석 키트 시약의 통합성 및 분석의 표준화에 대해 유용한 지표이다.

[0456] 당해 키트는 또한 임의로 진단 분석을 수행하거나 품질 대조군 평가를 촉진시키기 위해 요구되는 기타 시약, 예를 들어, 완충제, 염, 효소, 효소 조인자, 효소 기질, 검출 시약등을 포함한다. 완충제 및 시험 샘플의 분리 및/또는 치료용 용액(예를 들어 전처리 시약)과 같은 기타 성분들이 또한 키트에 포함될 수 있다. 당해 키트는 하나 이상의 기타 대조군을 포함할 수 있다. 키트의 하나 이상의 성분은 동결건조될 수 있고 이 경우에 당해 키트는 추가로 동결건조된 성분의 재구성을 위해 적합한 시약을 포함할 수 있다.

[0457] 키트의 다양한 성분은 임의로 필요한 만큼 적합한 컨테이너, 예를 들어, 미세적정 플레이트로 제공된다. 당해 키트는 추가로 샘플을 유지하거나 저장하기 위한 컨테이너(예를 들어, 뇨 샘플용 컨테이너 또는 카트릿지)를 포함할 수 있다. 경우에 따라, 당해 키트는 임의로 또한 반응 용기, 혼합 용기 및 시약 또는 시험 샘플의 제조를 촉진시키는 기타 성분을 포함할 수 있다. 당해 키트는 또한 시험 샘플을 수득하기 위한 하나 이상의 장비, 예를 들어, 시린지, 피펫, 포르셋, 측정 스폰 등을 포함할 수 있다.

[0458] 검출가능한 표지가 하나 이상의 아크리디늄 화합물인 경우, 키트는 하나 이상의 아크리디늄-9-카복사아미드, 하나 이상의 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르, 또는 이의 임의의 배합물을 포함할 수 있다. 검출가능한 표지가 하나 이상의 아크리디늄 화합물인 경우, 당해 키트는 또한 과산화수소 공급원, 예를 들어, 완충액, 용액 및/또는 하나 이상의 염기성 용액을 포함할 수 있다. 경우에 따라, 당해 키트는 고형상, 예를 들어, 자기 입자, 비드, 시험 튜브, 미세적정 플레이트, 큐벳, 막, 스캐폴딩 분자, 필름, 여과지, 디스크 또는 칩을 함유할 수 있다.

[0459] C. 키트 및 방법의 변형

[0460] 본원에 기재된 바와 같은 면역분석과 같은 분석에 의한 시험 샘플중에 분석물의 존재, 양 또는 농도를 결정하는 방법 뿐만 아니라 키트(또는 이의 성분들)은 예를 들어, 미국 특허 제5,089,424호 및 제5,006,309호에 기재된 바와 같이 및 제조원[Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)]에서 ARCHITECT®

로서 시판되는 바와 같이 다양한 자동화된 반-자동화된 시스템(고형상이 미세입자를 포함하는 것들을 포함)에 사용하기 위해 변형될 수 있다.

[0461]

비자동화된 시스템(예를 들어, ELISA)과 비교하여 자동화되거나 반자동화된 시스템간의 몇몇 차이는 제1 특이적 결합 파트너(예를 들어, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 이의 단편, 이의 변이체 또는 이의 변이체의 단편), 본원에 기재된 결합 단백질, 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 이의 변이체 또는 변이체의 단편))이 부착되는 기질(어느 방식으로든지 샌드위치 형성 및 분석물 반응이 영향받을 수 있다) 및 포획 길이 및 시간, 검출 및/또는 임의의 선택적 세척 단계들을 포함한다. 비자동화된 포맷, 예를 들어, ELISA는 샘플 및 포획 시약과 비교적 긴 항온처리 시간(예를 들어 약 2시간)을 필요할 수 있는 반면 자동화 또는 반자동화된 포맷(예를 들어, ARCHITECT®

, Abbott Laboratories)은 비교적 짧은 항온처리 시간(예를 들어, 대략 (예를 들어, ARCHITECT®

에 대해 18분)을 가질 수 있다. 유사하게, 비자동화된 포맷, 예를 들어, ELISA는 비교적 긴 항온처리 시간(예를 들어, 약 2시간)동안 접합체 시약과 같은 검출 항체를 항온처리할 수 있는 반면 자동화 또는 반자동화 포맷(예를 들어, ARCHITECT®

)은 비교적 짧은 항온처리 시간(예를 들어, ARCHITECT®

에 대해 약 4분)을 가질 수 있다.

[0462]

제조원[Abbott Laboratories]으로부터 시판되는 다른 플랫폼은 AxSYM®

, IMx®

(참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,294,404호), PRISM®

, EIA (비드), 및 Quantum™ II, 및 기타 플랫폼을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 당해 분석, 키트 및 키트 성분들을 다른 포맷, 예를 들어, 전기화학적 또는 기타 수동 또는 포인트 오브 케어 분석 시스템에 사용될 수 있다. 본 발명은 예를 들어, 샌드위치 면역분석을 수행하는 시판되는 제품[Abbott Point of Care (i-STAT®

, Abbott Laboratories)] 전기화학적 면역분석 시스템에 적용될 수 있다. 단일 용도 시험 장치에서 면역센서 및 이들의 제조 및 작동 방법은 예를 들어, 미국 특허 제 5,063,081호, 미국 특허 제7,419,821호; 및 제7,682,833호; 및 미국 특허 공개 제20040018577호 및 제20060160164호에 기재되어 있다.

[0463]

특히, I-STAT®

시스템에 대한 분석물 분석 적용과 관련하여, 하기의 배열이 바람직하다. 마이크로 조립된 규소 칩은 한쌍의 골드 전류측정 작동 전극 및 실버-실버 클로라이드 표준 전극과 함께 제조된다. 작동 전극중 하나에 대해, 고정화된항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편), 본원에 기재된 결합 단백질, 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체 단편)이 고정화된 폴리스티렌 비드(0.2mm 직경)를 전극에 대해 패턴화된 폴리비닐 알콜의 중합체 피복물에 부착시킨다. 이러한 칩은 면역분석에 적합한 유체공학적 포맷을 갖는 I-STAT®

카트릿지로 어셈블리된다. 카트릿지 샘플 유지 챔버 벽 부분상에 분석물에 대한 특이적 결합 파트너, 예를 들어, 항-분석물인 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편), 본원에 기재된 결합 단백질, 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)(이중 어느 하나는 검출 가능하게 표지될 수 있다)를 포함하는 층이 있다. 카트릿지의 유체 파우치내에는 p-아미노페놀 포스페이트를 포함하는 수성 시약이 있다.

[0464]

작업에서, 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 샘플은 시험 카트릿지의 보유 챔버에 첨가되고 당해 카트릿지는 I-STAT®

판독기로 삽입된다. 분석물에 대한 특이적 결합 파트너가 샘플에 용해된 후, 카트릿지내 펌프 요소는 샘플을, 칩을 함유하는 회로로 강제 이동시킨다. 여기서, 이것은 샌드위치의 형성을 촉진시키기 위해 진동시킨다. 분석

의 끝에서 두번째 단계에서, 유체를 파우치로부터 당해 회로로 강제 배출시켜 칩으로부터 샘플을 세척하고 폐기 챔버내로 보낸다. 분석의 두번째 단계에서, 알칼린 포스파타제 표지를 p-아미노페놀 포스페이트와 반응시켜 포스페이트 그룹을 절단하고 유리된 p-아미노페놀이 작동 전극에서 전기화학적으로 산화되도록 한다. 측정된 전류를 기준으로 판독기는 내장된 알고리즘 및 공장-결정된 계산 곡선을 수단으로 샘플내 분석물의 양을 계산할 수 있다.

[0465] 또한 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 키트는 필수적으로 면역분석을 수행하기 위한 다른 시약 및 방법을 포함한다. 예를 들어, 당업계에 공지되고/되거나 용이하게 제조되거나, 예를 들어, 접합체 회석제로서, 미세입자 회석제로서 및/또는 계산기 회석제로서 세척을 위해 사용되도록 최적화된 다양한 완충제가 포함된다. 예시적인 접합체 회석제는 특정 키트 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)에 사용되는 ARCHITECT®

접합체 회석제이고 2-(N-모르폴리노)에탄설포산(MES), 염, 단백질 차단제, 항미생물 제제 및 세제를 함유한다. 예시적인 계산기 회석제는 특정 키트(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)에 사용되는 ARCHITECT®

사람 계산기 회석제이고 이는 MES, 기타 염, 단백질 차단제 및 항미생물제를 함유하는 완충액을 포함한다. 추가로 2008년 12월 31일자로 출원된 미국 특허원 제61/142,048호에 기재된 바와 같이 예를 들어, 시그날 증폭기로서 시그날 항체에 연결된 핵산 서열을 사용하여 I-Stat 카트릿지 포맷에서 개선된 시그날 생성이 수득될 수 있다.

[0466] **예중**

[0467] 본 분야의 전문가들은 본원에 기술된 방법의 다른 적절한 변형 및 응용들이 자명한 것이고 본 발명의 청구 범위에 속한 적합한 균등 방법 또는 본원에 기술된 양태를 사용하여 이루어질 수 있음을 충분히 이해할 것이다. 이하, 본 발명을 상세하게 설명하여 하기 실시예의 참조에 의해 보다 명확하게 이해될 것이며, 하기 실시예는 실험의 목적으로 포함되는 것이고, 청구된 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

[0468] **실시예**

[0469] **실시예 1: DVD-Ig의 디자인, 작제 및 분석**

[0470] **실시예 1.1: 모 항체 및 DVD-Ig를 동정하고 특성 분석하기 위해 사용되는 분석**

[0471] 하기의 분석은 달리 언급되지 않는 경우 실시예 전반에 걸쳐 사용되어 모 항체 및 DVD-Ig를 동정하고 특성 분석한다.

[0472] **실시예 1.1.1: 이들의 표적 항원(들)에 대한 모 항체 및 DVD-Ig의 결합 및 친화성을 결정하기 위해 사용되는 분석**

[0473] **실시예 1.1.1A: 직접적인 결합 ELISA**

[0474] 목적하는 표적 항원에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위한 효소 연결된 면역흡착 분석을 다음과 같이 수행한다. 고 결합 ELISA 플레이트(Corning Costar # 3369, Acton, MA)를 포스페이트 완충 식염수(10X PBS, Abbott Bioresearch Center, Media Prep# MPS-073, Worcester, MA)중에서 4℃에서 밤새 100 μL/웰의 10 μg/ml의 목적하는 표적 항원(R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 목적하는 표적 항원 세포외 도메인/FC 융합 단백질(R&D Systems, Minneapolis, MN) 또는 모노클로날 마우스 항-폴리히스티딘 항체(R&D Systems # MAB050, Minneapolis, MN)로 피복시킨다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다. 플레이트를 실온에서 1/2 시간동안 300 μL/웰 차단 용액 (PBS중에서 2%로 희석된 비 지방 무수 밀크 분말, 다양한 소매 공급업체)을 첨가하여 차단시킨다. 플레이트를, 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 차단시킨 후 4회 세척한다.

[0475] 또한, 히스티딘(His) 태그된 목적하는 표적 항원(R&D Systems, Minneapolis, MN)의 10 μg/ml의 웰당 100 μL를 상기된 바와 같이 모노클로날 마우스 항-폴리히스티딘 항체로 피복된 ELISA 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리한다. 웰을 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0476] 상기된 바와 같은 차단 용액중에 희석된 항체 또는 DVD-Ig 제제의 100 μL를 상기된 바와 같이 제조된 목적하는 표적 항원 플레이트 또는 목적하는 표적 항원/FC 융합 플레이트 또는 항-폴리히스티딘 항체/His 태그된 목적하는 표적 항원 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간동안 항온처리한다. 웰을 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0477] 10ng/mL 염소 항-사람 IgG-FC 특이적 HRP 접합된 항체(Southern Biotech # 2040-05, Birmingham, AL)의 100 μL

를 목적하는 표적 항원 플레이트 또는 항-폴리히스티딘 항체/히스티딘 태그된 목적하는 표적 항원 플레이트의 각각의 웰에 첨가한다. 또한, 10ng/mL 염소 항-사람 IgG-카파 경쇄 특이적 HRP 접합된 항체(Southern Biotech # 2060-05 Birmingham, AL) 100 $\mu$ L를 목적하는 표적 항원/FC 융합 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 1 시간동안 항온처리한다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0478] 증진된 TMB 용액(Neogen Corp. #308177, K Blue, Lexington, KY) 100 $\mu$ L를 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 10분 동안 항온처리한다. 당해 반응은 50  $\mu$ L 1N 황산을 첨가하여 종료시킨다. 플레이트를 450nm 파장에서 분광측정으로 판독한다.

[0479] **실시예 1.1.1.B: 포획 ELISA**

[0480] ELISA 플레이트(Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY)는 항-사람 Fc 항체 (PBS중 5 $\mu$ g/ml, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 4°C에서 밤새 항온처리한다. 플레이트를 세척 완충액(0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS)중에서 3회 세척하고, 차단 완충액(1% BSA 함유 PBS)중에서 25°C에서 1시간동안 차단시킨다. 웰을 3회 세척하고 0.1% PBS 함유 PBS 중에서 각각의 항체 또는 DVD-Ig의 연속 희석액을 웰에 첨가하고 1시간동안 25°C에서 항온처리한다. 웰을 3회 세척한 후 비오틴화 항원(2nM)을 플레이트에 첨가하고 25°C에서 1시간동안 항온처리한다. 당해 웰을 3회 세척하고 스트렙타비딘-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD)로 25°C에서 1시간동안 항온처리한다. 당해 웰을 3회 세척하고 100  $\mu$ L의 ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL)를 웰 마다 첨가한다. 색 변화 후 반응을 1N HCL로 종료시키고 450nm에서의 흡광도를 측정한다.

[0481] **실시예 1.1.1.C: IgG-Fc 포획 ELISA**

[0482] 96-웰 Nunc-Immuno 평판을 PBS (Gibco #10010-023, Invitrogen, Grand Island, NY)중의 2  $\mu$ g/mL 염소-항-사람 IgG Fc 특이적 항체 (Jackson ImmunoResearch # 109-055-098, West Grove, PA, 50  $\mu$ L/웰)로 피복하고 4°C에서 밤새 배양한다. 평판을 세척 완충액 (PBS, 0.05% 트윈 20)으로 3회 세척하고, 이어서 실온에서 1시간 동안 100  $\mu$ L/웰의 차단 완충액 (PBS, 2% BSA)로 차단한다. 평판을 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 적절한 항체 또는 DVD-Ig의 1  $\mu$ g/mL 용액 50  $\mu$ L/웰과 함께 배양한다. 1시간 배양 후, 평판을 3회 세척하고 50  $\mu$ L/웰의 His-태그된 재조합 항원 단백질 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 최종 용량 범위 1000 nM 내지 0 nM)과 함께 배양한다. 평판을 3회 세척하고 50  $\mu$ L/웰의 토끼-항-His 태그-HRP 항체 (Abcam ab1187, Cambridge, MA, 2% BSA/PBS 용액 중에 1:10,000으로 희석됨)을 첨가하고 평판을 실온에서 1시간 동안 배양한다. 마지막 세척 후, 50  $\mu$ L/웰의 TMB 기질 (Pierce #34028, Rockford, IL)을 첨가하고, 5분 후 50  $\mu$ L/웰의 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 반응 종결시킨다. 450 nm에서 흡광도를 판독한다 (Spectra Max Plus 평판 판독기, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). EC<sub>50</sub>은 GraphPadPrism 4.03으로 계산한다.

[0483] **실시예 1.1.1.D: 바이아코어 기술을 이용한 친화도 측정**

[0484] 바이아코어 방법:

[0485] 바이아코어 분석(Biacore, Inc, Piscataway, NJ)으로 결합속도 및 해리속도 상수의 역학적 측정으로 항체 또는 DVD-Ig의 친화성을 측정한다. 표적 항원(예를 들어, 정제된 재조합 표적 항원)에 대한 항체 또는 DVD-Ig의 결합은 25°C에서 Biacore®

1000 또는 3000 장치(Biacore®

AB, Uppsala, Sweden)(작동 HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.005% 계면활성제 P20을 사용함)으로 표면 플라스몬 공명 기반 측정으로 측정한다. 모든 화학물질은 Biacore®

AB (Uppsala, Sweden)로 부터 구입하거나 텍스트에 기재된 바와 같은 다른 공급원으로부터 구입한다. 예를 들어, 10mM 나트륨 아세테이트(pH 4.5)에 희석된 대략 5000 RU의 염소 항-마우스 IgG, (Fc  $\gamma$ ), 단편 특이적 폴리클로날 항체(Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)는 25 $\mu$ g/ml에서 제조업자의 지침 및 과정에 따라 표준 아민 커플링 키트를 사용하는 CM5 연구 등급 바이오센서 칩 전반에 걸쳐 직접 고정화시킨다. 바이오센서 표면상에 미반응된 잔기는 에탄올아민으로 차단시킨다. 플로우셀 2 및 4에서 변형된 카복시메틸 텍스트란 표면은 반응 표면으로서 사용한다. 플로우 셀 1 및 3에서 염소 항-마우스 IgG 없이 변형되지 않은 카복시메틸 텍스트란은 표준 표면으로서 사용한다. 역학적 분석을 위해, 1:1 랑그뮤르 결합 모델로부터 유래된 속도 방정식은 Biaevaluation 4.0.1 소프트웨어를 사용한 모든 8개 주사(범용 적용 분석)의 연합 및 해리 단계에 동시에 적용한다. 정제된 항체 또는 DVD-Ig는 염소 항-마우스 IgG 특이적 반응 표면에 걸친 포획을 위해 HEPES 완충 식염수

에 희석시킨다. 리간드( $25\mu\text{g/ml}$ )로서 포획된 항체 또는 DVD-Ig는  $5\mu\text{l}$ /분의 유속에서 반응 매트릭스상에 주사한다. 결합 및 해리 속도 상수,  $k_{on}$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) 및  $k_{off}$  ( $\text{s}^{-1}$ )는  $25\mu\text{l}$ /분의 연속적인 유속하에 측정한다. 속도 상수는 10 내지 200nM 범위의 상이한 항원 농도에서 역학적 결합 측정을 수행함에 의해 유도된다. 항체 또는 DVD-Ig와 표적 항원간의 반응의 평형 결합 상수(M)는 이어서 하기 식에 의해 역학적 속도 상수로부터 계산한다:  $K_D = k_{off}/k_{on}$ . 결합은 시간의 함수로서 기록하고 역학적 속도 상수를 계산한다. 본 분석에서,  $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 로 신속한 결합 속도 및  $10^{-6}\text{s}^{-1}$ 로 느린 해리 속도가 측정될 수 있다.

[0486] **실시예 1.1.2: 모 항체 및 DVD-Ig의 기능적 활성을 결정하기 위해 사용되는 분석**

[0487] **실시예 1.1.2.A: 사이토킨 생분석**

[0488] 항-사이토킨 또는 항-성장 인자 모 항체 또는 항-사이토킨 또는 항-성장 인자 서열을 함유하는 DVD-Ig가 표적 사이토킨 또는 성장 인자 생화성을 억제하거나 증화시키는 능력은 항체 또는 DVD-Ig의 억제 능력을 결정함에 의해 분석한다. 예를들어, IL-4 매개된 IgE 생성을 억제하는 항-IL-4 항체의 능력을 사용할 수 있다. 예를들어, 사람 순수 B 세포는 피콜-플라크 밀도 원심분리에 이어서 사람 sIgD FITC 표지된 염소 F(ab)2 항체에 대해 특이적인 MACS 비드(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에 이어서 항-FITC MACS 비드를 사용한 자기적 분리에 의해 각각 말초 혈액, 연막으로 부터 분리한다. 자기적으로 분류된 순수 B 세포는 XV15에서  $\text{ml 당 } 3 \times 10^5$  세포로 조정하고 5%  $\text{CO}_2$ 의 존재하에  $37^\circ\text{C}$ 에서 배양 10일동안에 PBS 채워진 웰에 의해 둘러싸여진 플레이트의 중앙에  $6 \times 6$  배열로 96웰 플레이트 웰당  $100\mu\text{l}$ 로 분주하였다. 각각의 하나의 플레이트는 시험될 항체당 제조하고 각각 비유도된 및 유도된 대조군, 및  $7\mu\text{g/ml}$ 에서 시작하여 항체 적정의 4회 반복체 및  $50\mu\text{l}$  4회 농축된 예비 희석에 첨가된  $29\text{ng/ml}$  최종 농도로 하향된 3배 희석으로의 작동의 각각의 3개의 웰로 이루어진다. IgE 생산을 유도하기 위해,  $20\text{ng/ml}$ 에서 rhIL-4 및  $50\mu\text{l}$  중의  $0.5\mu\text{g/ml}$  최종 농도에서 항-CD40 모노클로날 항체 (Novartis, Basel, Switzerland) 각각을 각각의 웰에 첨가하고 IgE 농도는 표준 샌드위치 ELISA 방법에 의한 배양 시기의 말기에 측정한다.

[0489] **실시예 1.1.2.B: 사이토킨 방출 분석**

[0490] 사이토킨 방출을 유발하는 모 항체 또는 DVD-Ig의 능력을 분석한다. 말초 혈액을 혈관구멍에 의해 해파린 처리된 혈관 튜브내로 3명의 건강한 공여자로부터 인출한다. 전혈을 RPMI-1640 배지로 1:5로 희석하고 웰당  $0.5\text{ml}$ 에서 24웰 조직 배양 플레이트에 첨가한다. 항-사이토킨 항체(예를들어, 항-IL-4)를 RPMI-1640상으로 희석하고 200, 100, 50, 10, 및  $1\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도가 되도록  $0.5\text{ml}$ /웰로 플레이트에 첨가한다. 배양 플레이트내 전혈의 최종 희석은 1:10이다. LPS 및 PHA를 사이토킨 방출을 위한 양성 대조군으로서 별도의 웰에  $2\mu\text{g/ml}$  및  $5\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 가한다. 폴리클로날 사람 IgG를 네가티브 대조군 항체로서 사용한다. 당해 실험을 2회 수행한다. 플레이트를 5%  $\text{CO}_2$ 에서  $37^\circ\text{C}$ 에서 배양한다. 24시간 후 웰의 내용물을 시험관으로 옮기고 1200rpm에서 5분동안 회전시킨다. 무세포 상등액을 수거하고 사이토킨 분석을 위해 동결시킨다. 플레이트상 및 튜브내에 잔류하는 세포를  $0.5\text{ml}$ 의 용해 용액으로 용해시키고  $-20^\circ\text{C}$ 에 놓고 해동시킨다.  $0.5\text{ml}$ 의 배지를 첨가하고(용량이 무세포 상등액 샘플과 동일한 수준이 되도록 하면서) 세포 제제를 수거하고 사이토킨 분석을 위해 동결시킨다. 세포 부재 상등액 및 세포 용해물을 ELISA에 의해 사이토킨 수준, 예를 들어, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RA, 또는 TNF- $\alpha$  수준에 대해 분석한다.

[0491] **실시예 1.1.2.C: 사이토킨 교차-반응성 연구**

[0492] 목적하는 사이토킨에 대해 지시된 항-사이토킨 모 항체 또는 DVD-Ig가 기타 사이토킨과 교차 반응하는 능력을 분석한다. 모 항체 또는 DVD-Ig를 바이아코어 바이오센서 매트릭스상에 고정화시킨다. 항-사람 Fc mAb를 유리 아민 그룹을 통해  $100\text{mM}$  N-하이드록시숙신이미드(NHS) 및  $400\text{mM}$  N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)와 함께 매트릭스 상에 제1 활성화 카복실 그룹에 의해 텍스트란 매트릭스로 공유 결합시킨다. 나트륨 아세테이트(pH 4.5)에서 희석된  $25\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각의 항체 또는 DVD-Ig 제제 각각의 대략  $50\mu\text{l}$ 를 활성화된 바이오센서를 거쳐 주사하고 단백질상의 유리 아민을 활성화된 카복실 그룹으로 직접 결합시킨다. 전형적으로, 5000 공명 유니트(RU) s를 고정화시킨다. 미반응된 매트릭스 EDC-에스테르를 1M 에탄올 아민의 주사에 의해 불활성화시킨다. 1초 유속 세포를 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 사람 IgG1/K를 고정화 시킴에 의해 표준 물질로서 제조한다. SPR 측정은 CM 바이오센서 칩을 사용하여 수행한다. 바이오센서 표면상에 분석될 모든 항원은 0.01% P20을 함유하는 HBS-EP 작동 완충액중에 희석시킨다.

- [0493] 사이토킨 특이성을 조사하기 위해, 목적하는 과량의 사이토킨(100nM, 예를들어, 가용성 재조합 사람)을 항-사이토킨 모 항체 또는 DVD-Ig 고정화된 바이오센서 표면(5분 접촉 시간)에 걸쳐 주사한다. 목적하는 사이토킨의 주사 전 및 이후 즉시, HBS-EP 완충액 단독을 각각의 유동 셀을 통해 유동시킨다. 사이토킨 주입 완료 후 대략 30 초에 상응하는 시점 및 기준선간의 총 차이는 최종 결합 값을 나타내도록 취한다. 다시, 당해 반응은 공명 유닛으로 측정한다. 바이오센서 매트릭스는 결합 반응이 관찰되는 다음 샘플의 주사 전에 10mM HCl을 사용하여 소행 시키거나 작동 완충액을 매트릭스상에 주사하였다. 사람 사이토킨(예를 들어, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-27, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , 및 IFN- $\gamma$ )은 또한 동시에 고정화된 마우스 IgG1/K 표준 표면상에 주사하여 임의의 비특이적 결합 배경을 기록한다. 표준 및 반응 표면을 제조함에 의해, 바이오코어는 굴절 지수 변화 및 주사 노이즈의 대부분을 제거하기 위해 반응 표면으로부터 참조 표면 데이터를 자동적으로 공제할 수 있다. 따라서, 항-사이토킨 항체 또는 DVD-Ig 결합 반응으로 인한 튜브 결합 반응을 확인할 수 있다.
- [0494] 목적하는 사이토킨이 고정화된 항-사이토킨 항체를 거쳐 주사되는 경우, 상당한 결합이 관찰된다. 10mM HCl 소생은 완전히 모든 비-공유 결합된 단백질을 제거한다. 센서그램의 조사는 가용성 사이토킨에 결합하는 고정화된 항-사이토킨 항체 또는 DVD-Ig가 강함을 보여준다. 목적하는 사이토킨과 예상된 결과를 확인 한 후 재조합 사람 사이토킨을 잔류하는 패널을 각각의 항체 또는 DVD-Ig에 대해 별도로 시험한다. 각각의 주사 사이클에 대해 항-사이토킨 항체 또는 DVD-Ig 결합되거나 미결합된 사이토킨의 양을 기록한다. 3개의 독립적인 실험으로부터의 결과를 사용하여 각각의 항체 또는 DVD-Ig의 특이성 프로필을 결정한다. 목적하는 사이토킨에 대한 예상되는 결합을 갖고 임의의 다른 사이토킨에는 결합하지 하지 않는 항체 또는 DVD-Ig를 선별한다.
- [0495] **실시예 1.1.2.D: 조직 교차 반응성**
- [0496] 조직 교차 반응성 연구는 3단계로 수행하고 제1 단계는 32개 조직의 냉동절편을 포함하고, 제2 단계는 38개 이하의 조직을 포함하고 제3 단계는 하기에 기재된 바와 같은 관련없는 3명의 성인으로부터의 추가의 조직을 포함한다. 연구는 통상 2개의 용량 수준에서 수행된다.
- [0497] **단계 1:** 사람 조직(부검 또는 생검으로부터 수득된 하나의 사람 공여자 기원의 32개 조직(전형적으로, 부신, 위장관, 전립선, 방광, 심장, 골격근, 혈액 세포, 신장, 피부, 골수, 간, 척수, 유방, 폐, 비장, 소뇌, 림프절, 고환, 대뇌피질, 난소, 흉선, 결장, 췌장, 갑상선, 내피, 부갑상선, 수뇨관, 안구, 뇌하수체, 나팔관 및 태반))의 냉동절편(약 5  $\mu$ m)을 대물 글래스상에 고정시키고 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다.
- [0498] **단계 2:** 부검 또는 생검에서 수득된 3명의 비관련 성인 기원의 38개 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경관, 식도, 안구, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도선, 수뇨관, 뇨 방광 및 자궁을 포함함) 기원의 사람 조직의 냉동절편(약 5  $\mu$ m)을 대물 글래스상에 고정시키고 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다.
- [0499] **단계 3:** 부검 또는 생검에서 수득된 3명의 비관련 성숙한 원숭이 기원의 38개 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경관, 식도, 안구, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도선, 수뇨관, 뇨 방광 및 자궁을 포함함) 기원의 시노물구스 원숭이 조직의 냉동절편(약 5  $\mu$ m)을 대물 글래스상에 고정시키고 건조시킨다. 조직 절편의 퍼옥시다제 염색은 아비딘-비오틴 시스템을 사용하여 수행한다.
- [0500] 항체 또는 DVD-Ig는 제2 비오틴화된 항-사람 IgG로 항온처리하고 면역 복합체가 되도록 한다. 항체 또는 DVD-Ig의 최종 농도 2 및 10  $\mu$ g/mL에서 면역 복합체를 대물 글래스상의 조직 절편상으로 첨가함에 이어서 조직 절편을 아비딘-비오틴 퍼옥시다제 키트를 사용하여 30분동안 반응시킨다. 후속적으로, 퍼옥시다제 반응을 위한 기질인 DAB (3,3'-디아미노벤지딘)은 조직 염색을 위해 4분동안 적용한다. 항원-세포파로스 비드를 양성 대조군 조직 절편으로서 사용한다. 표적 항원 및 사람 혈청 차단 연구는 추가의 대조군으로서 작용한다. 항체 또는 DVD-Ig의 최종 농도 2 및 10  $\mu$ g/mL에서의 면역 복합체는 표적 항원(최종 농도 100  $\mu$ g/ml) 또는 사람 혈청(최종 농도 10%)과 미리 30분동안 항온처리함에 이어서 대물 글래스상의 조직 절편상으로 첨가함에 이어서 조직 절편을 30분동안 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 키트와 반응시킨다. 후속적으로, 퍼옥시다제 반응을 위한 기질인 DAB (3,3'-디아미노벤지딘)을 조직 염색을 위해 4분동안 적용한다.
- [0501] 임의의 특이적 염색은 미지의 표적 항원의 공지된 발현시 예상치 않은 반응성 또는 예상된(예를 들어, 항원 발

현과 일치) 것으로 판단된다. 특정 판단된 염색은 강도 및 횟수에 대해 스코어한다. 단계 2(사람 조직)와 단계 3(시노물구스 원숭이 조직) 사이의 조직 염색은 유사하거나 상이한 것으로 판단된다.

[0502] **실시예 1.1.2.E: EGFR 모노클로날 항체 또는 DVD-Ig의 시험관내 성장 억제 효과**

[0503] 종양 세포상의 표적 항원과 결합하는 모 항체 또는 DVD-Ig의 종양치사 활성을 분석할 수 있다. 간단히 설명하면, 모 항체 또는 DVD-Ig를 D-PBS-BSA (Dulbecco, 0.1% BSA 함유 인산염 완충 염수) 20  $\mu$ l에 희석하여 사람 종양 세포에 180  $\mu$ l중의 0.01  $\mu$ g/mL 내지 100  $\mu$ g/mL의 최종 농도로 첨가한다. 평판을 5% CO<sub>2</sub> 습식 대기하에 37°C에서 3일간 배양한다. 각 웰에서 살아 있는 세포의 수를 제조사의 지침 (Promega, Madison, WI)에 따라 MTS 시약을 사용하여 정량하여 종양 성장 억제율을 결정한다. 항체를 처리하지 않은 웰을 0% 억제의 대조군으로 사용하고, 반면에 세포가 없는 웰은 100% 억제를 나타낸 것으로 판단한다.

[0504] **실시예 1.1.2.F: 모 항체 또는 DVD-Ig 항체의 시험관내 종양치사 효과**

[0505] 종양 세포상의 표적 항원과 결합하는 모 항체 또는 DVD-Ig의 종양치사 활성을 분석할 수 있다. 간단히 설명하면, 모 항체 또는 DVD-Ig를 D-PBS-BSA (Dulbecco, 0.1% BSA 함유 인산염 완충 염수)에 희석하고, 사람 종양 세포에 200  $\mu$ l중의 0.01  $\mu$ g/mL 내지 100  $\mu$ g/mL의 최종 농도로 첨가한다. 평판을 5% CO<sub>2</sub> 습식 대기하에 37°C에서 3일간 배양한다. 각 웰에서 살아 있는 세포의 수를 제조사의 지침 (Promega, Madison, WI)에 따라 MTS 시약을 사용하여 정량하여 종양 성장 억제율을 결정한다. 항체를 처리하지 않은 웰을 0% 억제의 대조군으로 사용하고, 반면에 세포가 없는 웰은 100% 억제를 나타낸 것으로 판단한다.

[0506] 아포토시스의 평가를 위해, 카스파제-3 활성화를 다음의 프로토콜에 따라 결정한다: 96 웰 평판중의 항체-처리된 세포를 실온하에 120  $\mu$ l의 1x용해 완충액 (1.67 mM Hepes, pH 7.4, 7 mM KCl, 0.83 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.11 mM EDTA, 0.11 mM EGTA, 0.57% CHAPS, 1 mM DTT, 1x프로테아제 억제제 콕테일 정; EDTA-없음; Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ)에서 20분간 진탕하면서 용해시킨다. 세포 용해 후, 80  $\mu$ l의 카스파제-3 반응 완충액 (48 mM Hepes, pH 7.5, 252 mM 자당, 0.1% CHAPS, 4 mM DTT 및 20  $\mu$ M Ac-DEVD-AMC 기질; Biomol Research Labs, Inc. Plymouth Meeting, PA)을 첨가하고 평판을 37°C에서 2시간 배양한다. 평판을 1420 VICTOR 멀티라벨 카운터 (Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL)에서 다음과 같이 세팅하여 관독한다: 여기=360/40, 방출=460/40. 동형 항체 대조-처리 세포에 비하여 항체-처리 세포의 형광 단위 증가가 나타나며, 이러한 증가는 아포토시스를 가리킨다.

[0507] **실시예 1.1.2.G: 항체 또는 DVD-Ig 작제물에 의한 수용체 활성화의 시험관내 억제**

[0508] 세포 수용체 또는 이들의 리간드에 결합하는 모 항체 또는 DVD-Ig를 수용체 활성화의 억제에 대해 검사할 수 있다. D-PBS-BSA (Dulbecco, 0.1% BSA 함유 인산염 완충 염수)에 희석된 모 항체 또는 DVD-Ig를 사람 암 세포에 0.01  $\mu$ g/mL 내지 100  $\mu$ g/mL (180  $\mu$ l)의 최종 농도로 첨가한다. 평판을 5% CO<sub>2</sub> 습식 대기하에 37°C에서 1시간 동안 배양한다. 성장 인자 (예, EGF)를 1 내지 100 ng/mL (20  $\mu$ l)의 최종 농도로 세포에 5 내지 15분 동안 첨가하여 수용체 (예, EGFR) 자가인산화를 자극한다. 항체를 처리하지 않은 웰을 0% 억제의 대조군으로 사용하고, 반면에 세포가 없는 웰은 100% 억제를 나타낸 것으로 판단한다. 세포 추출 완충액 (10 mM 트리스, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM 나트륨 오르토바나데이트, 1% 트리톤 X-100, 10% 글리세롤, 0.1% SDS 및 프로테아제 억제제 콕테일)과 배양하여 세포 용해물을 만든다. 예를 들어, 이들 세포 용해물중의 포스포-EGFR을 제조사의 지침에 따라 R&D 시스템의 p-EGFR ELISA 키트(#DYC1095, Minneapolis, MN)를 사용하여 결정한다.

[0509] **실시예 1.1.2.H: 항-종양 세포 항원 항체 또는 DVD-Ig의 단독 또는 화학요법과의 병용이 사람 암 이종이식편 (피하 측복부, 동소 또는 자연 전이)의 성장에 미치는 효능**

[0510] 사람 암 세포는 조직 배양 플라스크에서 99%의 생존율, 85%의 컨플루언스로 시험관내 성장시킨다. 19 내지 25 그램의 SCID 마우스 (Charles Rivers Labs)의 귀에 태그를 부착하고 면도한다. 이어서, 마우스의 우측복부에 0.2 ml의 2x10<sup>6</sup> 사람 종양 세포 (1:1 Matrigel)를 연구 당일에 피하 접종한다. 평균 종양 부피가 약 150 내지 200 mm<sup>3</sup>인 마우스의 연령별로 마우스의 크기를 맞춘 후 비히클 (PBS), 항체 또는 DVD-Ig의 투여 (IP, Q3D/주) 및/또는 화학요법을 개시한다. 접종 후 10일째부터 주당 2회씩 캘리퍼스 한 자루로 종양을 측정하고 종양 부피를 공식  $V=LxW^2/2$  ( $V$ :부피, mm<sup>3</sup>;  $L$ : 길이, mm;  $W$ : 너비, mm)으로 계산한다. 항체 또는 DVD-Ig의 단독 또는 화학요법과 병용하여 처리된 동물의 종양은 단지 비히클 또는 동형 대조 mAb가 투여된 동물의 종양에 비하여 종양

부피가 감소한 것으로 나타난다.

[0511] 실시예 1.1.2.I: 사람 종양 세포주의 표면의 모노클로날 항체의 결합에 대한 유세포분석 평가

[0512] 해당 세포 표면 항원을 과발현하는 안정한 세포주 또는 사람 종양 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수확하고 5% 태아 소 혈청이 함유된 인산염 완충 염수 (PBS/FBS)에 재현탁시킨다. 염색하기에 앞서 사람 종양 세포에 PBS/FCS중의 5 $\mu$ g/ml의 사람 IgG (100  $\mu$ l)를 병상에서 배양한다. 1x10<sup>5</sup> 내지 5x10<sup>5</sup> 세포를 PBS/FBS중의 항체 또는 DVD-Ig (2  $\mu$ g/mL)와 병상에서 30 내지 60분 동안 배양한다. 세포를 2회 세척하고 100  $\mu$ l의 F(ab')<sub>2</sub> 염소 항 사람 IgG, Fc  $\gamma$ -파이크오티트린 (PBS중의 1:200 희석)(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.#109-116-170)을 첨가한다. 병상에서 30분간 배양한 후 세포를 2회 세척하고 PBS/FBS에 재현탁시킨다. Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 형광을 측정한다.

[0513] 실시예 1.1.2.K: 활성화된 NK 세포의 표면의 모노클로날 항체의 결합에 대한 유세포분석 평가

[0514] 활성화된 NK 세포를 96 웰 환저 평판에 0.5x10<sup>5</sup> 세포/웰로 평판하였다. 항체 및 DVD-Ig를 FACS 완충액 (PBS pH 7.4중의 1% FBS)중에 10  $\mu$ g/ml로 희석하였다. 세포로부터 상청액을 제거하고 30  $\mu$ l의 희석된 항체 또는 DVD-Ig를 웰에 첨가하였다. 세포를 항체와 4℃에서 30분간 배양하였다. 배양 후 세포를 150  $\mu$ l의 FACS 완충액으로 3회 세척하였다. 세포를 1:125 희석된 R-PE 결합된 항-사람 IgG F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.#109-116-170), 항-CD56-APC (eBioscience, San Diego, CA, Cat.#17-0569) 또는 항-CD3-488 (eBioscience, San Diego, CA, Cat.#53-0037)과 함께 50  $\mu$ l의 FACS 완충액에 재현탁시키고 4℃에서 30분간 배양하였다. 세포를 3회 세척하고 마지막으로 100  $\mu$ l의 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 시료를 FACSCalibur 기기 (Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 분석하였다. 비-항체-처리된 대조 시료가 3의 GMFI를 갖도록 FL1, FL2 및 FL4에 대한 FACSCalibur 세팅을 조절하였다. 이어서, 실험 시료를 분석하였다. FlowJo 소프트웨어 (Treestar, Inc., Ashland, OR)을 사용하여 데이터를 분석하고 전방 및 측방 산란 게이트로 표시되는 CD56 양성 세포에 대한 R-PE GMFI를 결정하였다.

[0515] 표 3은 안정한 세포주 또는 NK 세포 둘 다에 대한 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 FACS 기하 평균치를 포함한다.

표 3

DVD-Ig 작제물의 형광 활성화 세포 분류(FACS)

| 모 항체 또는 DVD-Ig ID | N-말단 도메인(VD) | C-말단 가변 도메인(VD) | FACS 기하학적 평균 N-말단 | FACS 기하학적 평균 C-말단 |
|-------------------|--------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| AB121             | NKG2D        |                 | 31.06             |                   |
| AB001             | CD-20        |                 | 2354              |                   |
| DVD1052           | NKG2D        | CD-20           | 36.36             | 3                 |
| DVD1053           | CD-20        | NKG2D           | 511               | 31.66             |
| AB121             | NKG2D        |                 | 31.06             |                   |
| AB006             | CD-19 (서열 1) |                 | 974.1             |                   |
| DVD1054           | NKG2D        | CD-19 (서열 1)    | 28.26             | 902               |
| DVD1055           | CD-19 (서열 1) | NKG2D           | 1393              | 21.16             |
| AB121             | NKG2D        |                 | 31.06             |                   |
| AB033             | EGFR (서열 2)  |                 | ND                |                   |
| DVD1056           | NKG2D        | EGFR (서열 2)     | 31.36             |                   |
| DVD1057           | EGFR (서열 2)  | NKG2D           | ND                | 25.26             |
| AB121             | NKG2D        |                 | 31.06             |                   |
| AB004             | Her2 (서열 1)  |                 | ND                |                   |
| DVD1060           | NKG2D        | Her2 (서열 1)     | 28.86             | ND                |
| DVD1061           | Her2 (서열 1)  | NKG2D           |                   | 29.16             |
| AB121             | NKG2D        |                 | 31.06             |                   |
| AB064             | EGFR (서열 3)  |                 | ND                |                   |
| DVD1214           | NKG2D        | EGFR (서열 3)     | 33.76             | ND                |
| DVD1215           | EGFR (서열 3)  | NKG2D           | ND                | 31.66             |

[0516]

[0517] 모든 DVD-Ig는 이들의 세포 표면 표적과의 결합을 나타냈다. DVD-Ig의 N-말단 도메인은 모 항체 정도로 또는 모 항체보다 더 양호하게 세포 표면상의 표적과 결합하였다. 결합은 링커 길이를 조절함으로써 복원 또는 향상될 수 있다.

[0518] 실시예 1.1.2.L: FACSCanto를 이용한 유세포 분석에 의해 평가된 사람 종양 세포주의 표면에 대한 모노클로날

## 항체의 결합

[0519] 목적하는 세포 표면 항원을 과발현하는 안정한 세포주 또는 사람 종양 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수거하고 5% 태아 소 혈청(PBS/FBS)를 함유하는 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 재현탁시켰다. 염색 전에, 사람 종양 세포를 병상에서 PBS/FCS중의 (100  $\mu$ l) 사람 IgG 5  $\mu$ g/ml로 항온처리하였다.  $1-5 \times 10^5$  세포를 병상에서 30 내지 60분동안 PBS/FBS에서 항체 또는 DVD-Ig(2  $\mu$ g/ml)로 항온처리하였다. 세포를 2회 세척하고 100  $\mu$ l의 F(ab')<sub>2</sub> 염소 항 사람 IgG, Fc  $\gamma$ -Dylight488(PBS중의 1:200 희석) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.# 109-486-098)을 첨가하였다. 병상에서 30분 항온처리한 후, 세포를 3회 세척하고 PBS/FBS중에 재현탁시켰다. 형광을 Becton Dickinson FACSCanto 기기(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 측정하였다.

[0520] 표 4는 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 FACS 기하학적 평균을 포함한다.

표 4

FACSCanto를 이용한 DVD-Ig 작제물의 형광 활성화 세포 분류(FACS)

| 모 항체 또는 DVD-Ig ID | N-말단 도메인(VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | FACS 기하학적 평균 N-말단 | FACS 기하학적 평균 C-말단 |
|-------------------|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| AB121             | NKG2D        |                  | 284               |                   |
| AB033             | EGFR (서열 2)  |                  | 46994             |                   |
| DVD1056           | NKG2D        | EGFR (서열 2)      | 301               | 42643             |
| DVD1057           | EGFR (서열 2)  | NKG2D            | 47513             | 229               |
| AB121             | NKG2D        |                  | 284               |                   |
| AB004             | Her2 (서열 1)  |                  | 437               |                   |
| DVD1060           | NKG2D        | Her2 (서열 1)      | 299               | 159               |
| DVD1061           | Her2 (서열 1)  | NKG2D            | 402               | 220               |

[0521]

[0522] 모든 DVD-Ig는 이들의 세포 표면 표적에 결합하는 것으로 나타났다. DVD-Ig의 N-말단 도메인은 모 항체 보다 우수하게 세포 표면상의 이들의 표적에 결합하였다. 결합은 링커 길이를 조정함에 의해 복구시키거나 개선시킬 수 있다.

[0523] 실시예 1.2: 목적하는 사람 항원에 대한 모 모노클로날 항체의 생성

[0524] 목적하는 사람 항원에 결합하고 이를 중화시킬 수 있는 모 마우스 mAb 및 이의 변이체를 다음과 같이 수득하였다:

[0525] 실시예 1.2.A: 목적하는 사람 항원을 사용한 마우스의 면역화

[0526] 완전 프론트 보조제 또는 면역분석 보조제 (Qiagen, Valencia, CA)와 혼합된 20  $\mu$ g의 재조합 정제된 사람 항원 (예를 들어, IGF 1,2)을 1일째에 5마리의 6-8 주령 Balb/C, 5마리의 C57B/6 마우스, 및 5마리의 AJ 마우스로 피하 주사하였다. 24일, 38일 및 49일째에, 불완전 프론트 보조제 또는 면역분석 보조제와 혼합된 20  $\mu$ g의 재조합 정제된 사람 항원 변이체를 동일한 마우스에 피하 주사한다. 84일째 또는 112일째 또는 144일째에, 마우스를 목적하는 1  $\mu$ g의 재조합 정제된 사람 항원으로 정맥내 주사한다.

[0527] 실시예 1.2.B: 하이브리도마의 생성

[0528] 실시예 1.2.A에 기재된 면역화된 마우스로부터 수득된 비장세포는 문헌[참조: Kohler, G. and Milstein (1975) Nature, 256:495]에 기재된 확립된 방법에 따라 5:1의 비율로 SP2/O-Ag-14 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생성한다. 웰당  $2.5 \times 10^6$  비장 세포의 밀도로 96 웰 플레이트에서 아자세린 및 하이포산틴을 함유하는 선택 배지에 플레이팅하였다. 융합한지 7일 내지 10일 후, 거시적 하이브리도마 콜로니를 관찰한다. 하이브리도마 콜로니를 함유하는 각각의 웰 기원의 상등액은 목적하는 항원에 대한 항체의 존재에 대해 ELISA로 시험한다(실시예 1.1.1.A에 기재된 바와 같이). 항원-특이적 활성을 나타내는 상등액을 이어서 활성(실시예 1.1.2의 분석에 기재된 바와 같이), 예를 들어, 실시예 1.1.2.I에 기재된 바와 같이 생분석에서 목적하는 항원을 중화시키는 능력에 대해 시험한다.

[0529] 실시예 1.2.C: 목적하는 사람 표적 항원에 대한 모 모노클로날 항체의 동정 및 특성 분석

**[0530] 실시예 1.2.C.1: 모 모노클로날 항체 중화 활성의 분석**

**[0531]** 하이브리도마 상등액은 실시예 1.2.A 및 1.2.B에 따라 생성된 목적하는 항원, 및 목적하는 항원의 변이체("항원 변이체")에 결합하는 모 항체의 존재에 대해 분석한다. 2개 분석에서 양성인 항체를 갖는 상등액은 이어서 예를 들어, 실시예 1.1.2.I의 사이토킨 생분석에서 이들의 항원 중화 효능에 대해 시험한다. 생분석에서 1,000pM 미만, 하나의 양태에서, 100pM 미만의 IC<sub>50</sub> 값으로 항체를 생성하는 하이브리도마는 제한 희석에 의해 스케일 업하고 클로닝한다. 하이브리도마 세포를 10% 낮은 IgG 태아 소 혈청(Hyclone #SH30151, Logan, UT)을 함유하는 배지로 증식시킨다. 평균적으로, 250 mL의 각각의 하이브리도마 상등액(클론 집단으로부터 유래함)을 문헌[참조: Harlow, E. and Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual"]에 기재된 바와 같이 수거하고 농축시키고 정제한다. 표적 항원의 활성을 억제하는 정제된 mAb의 능력은 예를 들어, 실시예 1.1.2.I에 기재된 바와 같은 사이토킨 생분석을 사용하여 측정한다.

**[0532] 실시예 1.2.C.2: 목적하는 시노물구스 표적 항원에 대한 모 모노클로날 항체 교차 반응성의 분석**

**[0533]** 본원에 기재된 선별된 mAb가 목적하는 시노물구스 항원을 인지하는지의 여부를 측정하기 위해, 본원(실시예 1.1.1.B)에 기재된 바와 같이 재조합 시노물구스 표적 항원을 사용하여 BIACORE 분석을 수행한다. 또한, 목적하는 재조합 시노물구스 항원에 대한 mAb의 중화 효능은 또한 사이토킨 생분석(실시예 1.1.2.A)에서 측정할 수 있다. 양호한 cyno 교차 반응성(하나의 양태에서, 사람 항원의 반응성의 5배 이내)을 갖는 mAb는 향후 특성 분석을 위해 선별한다.

**[0534] 실시예 1.2.D: 각각의 쥐 항-사람 모노클로날 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열의 측정**

**[0535]** cDNA의 분리, 재조합 항-사람 마우스 mAb의 발현 및 특성 분석은 다음과 같이 수행한다. 각각의 아미노산 서열 측정을 위해, 대략  $1 \times 10^6$  하이브리도마 세포를 원심분리로 분리하고 프로세싱하여 제조업자의 지침에 따라 트리졸(Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.)을 사용하여 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 제조업자의 지침에 따라 Superscript 제1 채 합성 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제1 채 DNA 합성에 적용한다. 올리고(dT)를 사용하여 제1 채 합성을 프라이밍하여 폴리(A)+ RNA에 대해 선별한다. 제1 채 cDNA 생성물은 이어서 쥐 면역글로불린 가변 영역(Ig-프라이머 세트, Novagen, Madison, WI)의 증폭을 위해 디자인된 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시킨다. PCR 생성물을 아가로스 겔상에서 분리하고 절단하고 정제함에 이어서 TOPO 클로닝 키트를 사용하여 pCR2.1-TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 서브클로닝하고 TOP10 화학적 컴피턴트 이.콜라이(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 형질전환시킨다. 콜로니 PCR은 형질전환체상에서 수행하여 삽입체를 함유하는 클론을 동정한다. 플라스미드 DNA를 QIAprep 미니프렙 키트(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 삽입체를 함유하는 클론으로부터 분리한다. 플라스미드내 삽입체를 양 채에 대해 서열 분석하여 M13 정배향 및 M13 역배향 프라이머(Fermentas Life Sciences, Hanover MD)를 사용하여 가변 중쇄 또는 가변 경쇄 DNA 서열을 측정한다. mAb의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 동정한다. 하나의 양태에서, 다음 단계로의 전개(사람화)를 위해 선행 mAb의 판넬에 대한 선별 기준은 다음을 포함한다:

**[0536]** ■ 항체는 CH2내 표준물을 제외하고는 임의의 N-연결된 당화 부위(NXS)를 함유하지 않는다.

**[0537]** ■ 항체는 항체 마다 정상적인 시스테인에 추가로 임의의 여분의 시스테인을 함유하지 않는다.

**[0538]** ■ 항체 서열은 VH 및 VL에 대한 가장 밀접한 사람 배선 서열과 정렬시키고 임의의 범상한 아미노산은 다른 천연 사람 항체에서의 존재에 대해 검사되어야만 한다.

**[0539]** ■ N-말단 글루탐산(Q)은 이것이 항체의 활성에 영향을 주지 않는다면 글루탐산(E)로 대체시킨다. 이것은 Q의 폐환으로 인해 이중성을 감소시킬 것이다

**[0540]** ■ 효율적인 시그널 서열 절단은 질량 분광측정기로 확인한다. 이것은 COS 세포 또는 293 세포 물질로 수행할 수 있다

**[0541]** ■ 단백질 서열은 실험시킬 수 있는 Asn의 탈아미드화의 위험성에 대해 검사한다

**[0542]** ■ 항체는 저수준의 응집을 갖는다

**[0543]** ■ 항체는 >5-10 mg/ml 용해도(연구단계에서) ; >25 mg/ml의 용해도를 갖는다.

**[0544]** ■ 항체는 동력 광 산란(DLS)에 의한 표준 크기((5-6 nm)를 갖는다

- [0545] ■ 항체는 낮은 전하 이중성을 갖는다.
- [0546] ■ 항체는 사이토킨 분비가 없다(참조: 실시예 1.1.2.B)
- [0547] ■ 항체는 의도된 사이토킨에 대해 특이성을 갖는다(참조: 실시예 1.1.2.C)
- [0548] ■ 항체는 예상된 조직 교차 반응성이 없다(참조: 실시예 1.1.2.D)
- [0549] ■ 항체는 사람과 시노물구스 조직 교차 반응성간에 유사성을 갖는다(참조: 실시예 1.1.2.D)
- [0550] **실시예 1.2.2: 재조합 사람화된 모 항체**
- [0551] **실시예 1.2.2.1: 재조합 키메라 항 사람 모 항체의 작제 및 발현**
- [0552] 마우스 항-사람 모 mAb의 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA는 세균에서 상동성 재조합에 의해 2 힌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유하는 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편으로 대체한다. 이들 돌연변이는 234 위치(EU 넘버링)에서 류신의 알라닌으로의 대체이고 235위치에서 류신의 알라닌으로의 대체이다(문헌참조: Lund et al. (1991) J. Immunol.: 147:2657). 3개 항체 각각의 경쇄 불변 영역은 사람 카파 불변 영역으로 대체한다. 전장 키메라 항체는 pBOS 발현 플라스미드 (Mizushima and Nagata (1990) Nucl. Acids Res. 18: 5322)로 연결된 키메라 중쇄 및 경쇄 cDNA의 동시 형질감염에 의해 COS 세포에서 일시적으로 발현된다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상등액을 단백질 A 세파로스 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충액의 첨가로 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석시킨다.
- [0553] 키메라 mAb를 암호화하는 중쇄 cDNA를 이의 키메라 경쇄 cDNA (이 둘다는 pBOS 벡터에서 연결된다)와 함께 COS 세포내로 동시 형질감염시킨다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상등액은 단백질 A 세파로스 크로마토그래피에 의해 정제하고 결합된 항체를 산 완충액의 첨가로 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석시킨다.
- [0554] 정제된 키메라 항-사람 환자 mAb를 이어서 결합하는 능력(바이어코어에 의해) 및 기능성 활성화, 예를 들어, 실시예 1.1.1. 및 1.1.2.에 기재된 바와 같은 IgE의 사이토킨 유도된 생산을 억제하는 능력에 대해 시험한다. 모 하 이브리도마 mAb의 활성을 유지하는 키메라 mAb는 추가의 전개를 위해 선별한다.
- [0555] **실시예 1.2.2.2: 사람화된 항 사람 모 항체의 작제 및 발현**
- [0556] **실시예 1.2.2.2.A: 사람 항체 골격의 선별**
- [0557] 각각의 쥐 가변 중쇄 및 가변 경쇄 유전자 서열은 별도로 벡터 NTI 소프트웨어를 사용하여 44개 사람 면역글로불린 배선 가변 중쇄 또는 46개 배선 가변 경쇄 서열(NCBI Ig Blast 웹사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.로부터 유래됨)에 대해 정렬시킨다.
- [0558] 사람화는 아미노산 서열 상동성, CDR 클러스터 분석, 발현된 사람 항체중에서 사용 횟수 및 사람 항체의 결정 구조에 대한 가용한 정보를 기초로 한다. 항체 결합, VH-VL 쌍형성 및 기타 인자에 대한 가능한 효과를 고려하여, 쥐 잔기를 사람 잔기로 돌연변이시키고 여기서 쥐 및 사람 골격 잔기는 몇가지를 제외하고는 상이하다. 추가의 사람화 전략은 쥐 항체 가변 영역의 아미노산 서열과 고도의 상동성, 즉 서열 유사성을 갖는 사람 배선 항체 서열 또는 이의 서브그룹을 기초로 디자인한다.
- [0559] 상동성 모델링을 사용하여 항체 결합 부위, CDR의 구조에 중요한 것으로 예상되는 쥐 항체 서열에 독특한 잔기를 동정한다. 상동성 모델링은 컴퓨터 방법으로서 이에 의해 대략적인 3차원 배위가 단백질에 대해 생성된다. 이들의 배위의 출처 및 추가 채신을 위한 가이드는 제2 단백질인 참조 단백질이고 이에 대한 3차원 배위는 공지되어 있고 이의 서열은 제1 단백질의 서열과 관련된다. 2개 단백질의 서열간의 관계를 사용하여 참조 단백질 및 이에 대한 배위가 요망되는 단백질인 표준 단백질간에 상응성을 생성시킨다. 참조 및 표적 단백질의 1차 서열은 표준 단백질로부터 표적 단백질로 직접 전달된 2개 단백질의 동일한 부분의 배위로 정렬한다. 2개 단백질의 불일치 부분, 예를 들어, 잔기 돌연변이, 삽입 또는 결실로부터의 불일치 부분에 대한 배위는 일반적인 구조 주형 및 이미 전달된 모델 배위와의 일치성을 보장하기 위해 개량된 에너지로부터 작제한다. 이러한 컴퓨터 단백질 구조는 모델링 연구에서 추가로 개량되거나 직접적으로 사용될 수 있다. 모델 구조의 질은 표준 및 표적 단백질이 관련되는 내용의 정확성 및 서열 정렬이 작제되는 정밀성에 의해 결정된다.
- [0560] 쥐 mAb에 대해, BLAST 탐색 및 육안 조사의 조합을 사용하여 적합한 표준 구조를 동정한다. 표준 및 표적 아미노산 서열간의 25%의 서열 동일성은 상동성 모델링 관행을 시도하는데 필요한 최소값으로 고려된다. 서열정렬은 수동으로 작제하고 모델 배위는 프로그램 Jackal로 생성시킨다(문헌참조: Petrey, D. et al. (2003) Proteins

53 (Suppl. 6): 430-435).

[0561] 선택된 항체의 쥐 및 사람 골격 영역의 1차 서열은 상당한 동일성을 공유한다. 상이한 잔기 위치는 쥐 항체의 관찰된 결합 효능을 보유하기 위해 사람화된 서열에서 쥐 잔기 내포에 대한 후보이다. 사람과 쥐 서열간에 상이한 골격 잔기의 목록은 수동으로 삭제한다. 표 5는 당해 연구에 대해 선택된 골격 서열을 보여준다.

표 5

사람 IgG 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 서열

| 단백질               | 서열 번호 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |       | 12345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 야생형 hIgG1 불변 영역   | 46    | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>LL</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK |
| 돌연변이체 hIgG1 불변 영역 | 47    | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK |
| Ig 카파 불변 영역       | 48    | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                          |
| Ig 람다 불변 영역       | 49    | QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTPSKQSNKYAAASSYLSTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTCS                                                                                                                                                                                                                                            |

[0562]

[0563] 주어진 골격 잔기가 항체의 결합 성질에 영향을 줄 가능성은 CDR 잔기로의 이의 접근성에 의존한다. 따라서, 모델 구조를 사용하여, 쥐와 사람 서열간에 상이한 잔기는 CDR 내 임의의 원자로부터 이들의 거리에 따라 등급화된다. 임의의 CDR 원자의 4.5Å내에 있는 잔기가 가장 중요한 것으로 동정되고 사람화된 항체(즉, 역돌연변이) 내 쥐 잔기의 보유에 대한 후보물로 추천된다.

[0564] 특히, 삭제된 사람화된 항체는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 삭제된다. 각각의 가변 영역 cDNA에 대한, 60 내지 80개 뉴클레오타이드의 6개 올리고뉴클레오타이드 각각은 각각의 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 말단에서 20개 뉴클레오타이드까지 서로 중첩하도록 디자인한다. 어닐링 반응에서, 모든 6개 올리고뉴클레오타이드를 dNTP의 존재하에 조합하고, 비등시키고 어닐링시킨다. DNA 폴리머라제 I, 대형(Klenow) 단편(New England Biolabs #M0210, Beverly, MA.)을 중첩 올리고뉴클레오타이드 간에 대략 40bp의 갭을 채우도록 첨가한다. 변형된 pBOS 벡터에서 다중 클로닝 부위에 상보적인 오버행 서열을 함유하는 2개의 최외곽 프라이머를 사용하는 PCR을 수행하여 전체 가변 영역 유전자를 증폭시킨다(문헌참조: Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 17). 각각의 cDNA 어셈블리로부터 유래된 PCR 생성물을 아가로스 겔상에서 분리하고 예측된 가변 영역 cDNA 크기에 상응하는 밴드를 절개하고 정제한다. 가변 중쇄 영역을 세균에서 상동성 재조합에 의해 2개 힌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유하는 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편상으로 프레임내 삽입한다. 이들 돌연변이는 234번 위치(EU 넘버링)에서 류신의 알라닌의 대체 및 235번 위치에서 류신의 알라닌으로의 대체이다(문헌참조: Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). 가변 경쇄 영역은 상동성 재조합에 의해 사람 카파 불변 영역과 함께 프레임내 삽입한다. 세균 콜로니를 분리하고 플라스미드 DNA를 추출한다. cDNA 삽입물은 이들의 전체를 서열 분석한다. 각각의 항체에 상응하는 올바른 사람화된 중쇄 및 경쇄를 COS 세포내로 동시 형질감염시켜 일시적으로 전장 사람화된 항-사람 항체를 제조한다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상등액은 단백질 A 세파로스 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충액을 첨가하여 용출시킨다. 항체는 중화시키고 PBS내로 투과시킨다.

[0565] 실시예 1.2.2.3: 사람화된 항체의 특성 분석

[0566] 기능적 활성을 억제하는 정제된 사람화된 항체의 능력은 예를 들어, 실시예 1.1.2.A에 기재된 바와 같은 사이토 킨 생분석을 사용하여 측정한다. 재조합 사람 항원에 대한 사람화된 항체의 결합 친화성은 실시예 1.1.1.B에 기

재된 바와 같은 표면 플라스몬 공명 (Biacore®)

) 측정을 사용하여 결정한다. 사람화된 항체의 생분석 및 친화성으로부터의 IC<sub>50</sub> 값을 등급화한다. 모 하이브리도마 mAb의 활성을 완전히 유지하는 사람화된 mAb는 향후 전개를 위한 후보물로서 선택한다. 최상의 2 내지 3개의 가장 선호되는 사람화된 mAb는 추가로 특징 분석한다.

[0567] 실시예 1.2.2.3.A: 사람화된 항체의 약리역학적 분석

[0568] 약리역학적 연구는 스프라그 돌리 랫트 및 시노몰구스 몽키에서 수행한다. 수컷 및 암컷 랫트 및 시노몰구스 몽키에게 단일 용량의 4mg/kg mAb를 정맥내 또는 피하 투여하고 샘플을 항원 포획 ELISA를 사용하여 분석하고 약리역학적 파라미터를 비격막 분석에 의해 측정한다. 간략하게, ELISA 플레이트를 염소 항-비오틴 항체로 피복시키고(5 mg/ml, 4° C, 밤새), Superblock (Pierce)으로 차단시키고, 실온에서 2시간동안 10% Superblock TTBS에서 50ng/ml의 비오틴화된 사람 항원으로 항온처리한다. 혈청 샘플을 연속으로 희석하고(TTBS중의 0.5% 혈청, 10% Superblock) 실온에서 30분동안 플레이트상에서 항온처리한다. 검출은 HRP-표지된 염소 항 사람 항체로 수행하고 농도는 4개 파라미터 로그 피트를 사용하여 표준 곡서의 도움으로 결정한다. 약리역학적 계수에 대한 값은 WinNonlin 소프트웨어(Pharsight Corporation, Mountain View, CA)를 사용한 비격막 모델에 의해 결정한다. 양호한 약리역학적 프로파일(T1/2는 8 내지 13일 또는 그보다 양호하고 낮은 제거 및 우수한 생물유용성 50 내지 100%)을 갖는 사람화된 mAb를 선별한다.

[0569] 실시예 1.2.2.3.B: 사람화된 모노클로날 항체의 물리화학적 및 시험관내 안정성 분석

[0570] 크기 배제 크로마토그래피

[0571] 항체는 물을 사용하여 2.5mg/ml로 희석하고 20ml를 TSK 겔 G3000 SWXL 칼럼(Tosoh Bioscience, cat# k5539-05k)을 사용하여 시마즈 HPLC 시스템상에서 분석한다. 샘플은 211mM 황산나트륨, 92 mM 인산나트륨, pH 7.0, 유속 0.3ml/분을 사용하여 칼럼으로부터 용출시킨다. HPLC 시스템 작동 조건은 다음과 같다:

[0572] 이동상: 211 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 92 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, pH 7.0

[0573] 농도구배: 등용매

[0574] 유속: 0.3 mL/분

[0575] 검출 파장: 280 nm

[0576] 자동샘플채취기 냉각기 온도: 4° C

[0577] 칼럼 오븐 온도: 주위 온도

[0578] 수행 시간: 50분

## 표 6

크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 측정된 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 순도

| 모 항체 또는 DVD-Ig ID | N-말단 가변 도메인(VD) | C-말단 가변 도메인(VD) | % 단량체 (순도) |
|-------------------|-----------------|-----------------|------------|
| AB121             | NKG2D           |                 | 100        |
| DVD1052           | NKG2D           | CD-20           | 97.5       |
| DVD1053           | CD-20           | NKG2D           | 94.2       |
| DVD1054           | NKG2D           | CD19            | 90.1       |
| DVD1055           | CD19            | NKG2D           | 88.7       |
| DVD1056           | NKG2D           | EGFR            | 88.3       |
| DVD1057           | EGFR            | NKG2D           | 88.1       |
| DVD1060           | NKG2D           | HER-2           | 100        |
| DVD1061           | HER-2           | NKG2D           | 94.1       |
| DVD1214           | NKG2D           | EGFR            | 100        |
| DVD1215           | EGFR            | NKG2D           | 91.8       |

[0579]

[0580] DVD-Ig는 90% 초과인 단량체를 보여주는 대부분의 DVD-Ig를 갖는 우수한 SEC 프로파일을 보여주었다. 이러한 DVD-Ig 프로파일은 모 항체에 대해 관찰된 것과 유사하다.

- [0581] **SDS-PAGE**
- [0582] 항체는 환원 및 비환원 조건 둘다에서 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석한다. Adalimumab lot AFP04C를 대조군으로서 사용한다. 환원 조건을 위해, 샘플은 1:1로 2X 트리스 글라이신 SDS-PAGE 샘플 완충액(Invitrogen, cat# LC2676, lot# 1323208) 및 100 mM DTT와 함께 혼합하고, 30분동안 60℃에서 가열한다. 비환원 조건을 위해, 당해 샘플은 샘플 완충액과 1:1로 혼합하고 5분동안 100℃에서 가열한다. 환원된 샘플(레인당 10mg)을 12% 프리캐스트 트리스-글라이신 겔(Invitrogen, cat# EC6005box, lot# 6111021)상에 로딩하고, 비환원된 샘플(레인당 10 mg)을 8%-16% 프리캐스트 트리스-글라이신 겔(Invitrogen, cat# EC6045box, lot# 6111021)상에 로딩한다. SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, cat#LC5925, lot# 1351542)를 분자량 마커로서 사용한다. 당해 겔을 XCell SureLock 소형 세포 겔 박스(Invitrogen, cat# EI0001)내에서 전개하고 단백질은 먼저 75 전압을 적용하여 샘플을 겔에 첨가하고 이어서 선행 염료가 겔의 바닥에 도달할때까지 125의 정전압을 걸어 분리한다. 사용되는 전개 완충액은 10 x 트리스 글라이신 SDS 완충액(ABC, MPS-79-080106)으로부터 제조된 1 x 트리스 글라이신 SDS 완충액이다. 당해 겔은 콜로이드 블루 염색 (Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016)을 사용하여 밤새 염색시키고 배경이 청명해질때까지 Milli-Q 물을 탈염색시킨다. 염색된 겔을 이어서 Epson Expression 스캐너 (model 1680, S/N DASX003641)를 사용하여 스캐닝한다.
- [0583] **침강 속도 분석**
- [0584] 항체는 3개의 표준 2-섹터 카본 에폰 센터피스의 샘플 챔버로 로딩한다. 이들 센터피스는 1.2cm 광학 경로 길이를 갖고 사파이어 윈도우로 구성된다. PBS는 표준 완충액의 위해 사용되고 각각의 챔버는 140  $\mu$ L를 함유한다. 모든 샘플은 Beckman ProteomeLab XL-I 분석 초원심분리(serial # PL106C01)에서 4-구멍(AN-60Ti)를 사용하여 동시에 조사한다.
- [0585] 수행 조건은 프로그램화되어 있고 원심분리 조절은 ProteomeLab (v5.6)를 사용하여 수행한다. 샘플 및 로터는 분석전에 1시간동안 열이 균질해지도록 한다( $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ). 적당한 세포 로딩의 확인은 3000rpm에서 수행하고 단일 스캔은 각각의 세포에 대해 기록한다. 침강 속도 조건은 하기와 같다:
- [0586] 샘플 세포 용적: 420  $\mu$ L
- [0587] 표준 셀 용적: 420  $\mu$ L
- [0588] 온도: 20℃
- [0589] 로터 속도: 35,000 rpm
- [0590] 시간: 8:00 시간
- [0591] UV 파장: 280nm
- [0592] 방사상 단계 크기: 0.003cm
- [0593] 데이터 수집: 시그널 평균화 없이 단계 마다 원 데이터 포인트
- [0594] 스캔 총 수: 100
- [0595] **온전한 항체의 LC-MS 분자량 측정**
- [0596] 온전한 항체의 분자량은 LC-MS에 의해 분석한다. 각각의 항체는 물을 사용하여 대략 1mg/ml로 희석시킨다. 단백질 마이크로트랩(Michrom Bioresources, Inc, cat# 004/25109/03)을 사용한 1100 HPLC (Agilent) 시스템을 사용하여 탈염시키고 5mg의 샘플을 API Qstar 펄서 i 질량 분광측정기 (Applied Biosystems)에 도입한다. 짧은 농도 구배를 사용하여 샘플을 용출시킨다. 농도 구배는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 물중의 0.08% FA, 0.02% TFA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.08% FA 및 0.02% TFA)를 사용하여 수행한다. 질량 분광측정기는 질량 대 전하 비율이 2000 내지 3500인 스캔 범위로 4.5 k볼트 분무 전압으로 수행한다.
- [0597] **항체 경쇄 및 중쇄의 LC-MS 분자량 측정**
- [0598] 항체 경쇄(LC), 중쇄(HC) 및 탈당화된 HC의 분자량 측정은 LC-MS에 의해 분석한다. 항체는 물을 사용하여 1 mg/mL로 희석시키고 샘플은 37℃에서 30분동안 10mM DTT의 최종 농도로 LC 및 HC로 감소시킨다. 항체 탈당화시키기 위해, 100 mg의 항체를 37℃에서 총 용적 100ml중에서 밤새 2 mL의 PNGase F, 5 mL의 10% N-옥틸글루코사이드로 항온처리한다. 탈글루코실화 후 샘플은 37℃에서 30분동안 10mM DTT의 최종 농도로 감소한다. C4 칼럼

(Vydac, cat# 214TP5115, S/N 060206537204069)을 갖는 Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하여 샘플(5mg)을 탈염시키고 API Qstar 펄스 i 질량 분광측정기(Applied Biosystems)에 도입한다. 짧은 농도 구배를 사용하여 샘플을 용출시킨다. 농도 구배는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 물중의 0.08% FA, 0.02% TFA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.08% FA 및 0.02% TFA)를 사용하여 수행한다. 질량 분광측정기는 질량 대 전하 비율이 800 내지 3500인 스캔 범위로 4.5 k볼트 분무 전압으로 수행한다.

[0599] **펩타이드 맵핑**

[0600] 항체를 실온에서 15분동안 75mM의 중탄산암모늄중의 6M 구아니딘 하이드로클로라이드의 농도로 변성시킨다. 변성된 샘플을 60분동안 37℃에서 10mM DTT의 최종 농도로 감소시킴에 이어서 30분동안 37℃에서 암실에서 50mM 요오도아세트산(IAA)를 사용하여 알킬화시킨다. 알킬화 후, 샘플을 4℃에서 4리터의 10mM 중탄산암모늄에 대해 밤새 투석시킨다. 투석된 샘플을 10mM 중탄산암모늄, pH 7.8을 사용하여 1mg/ml로 희석시키고 100 mg의 항체를 4시간동안 37℃에서 트립신/Lys-C: 항체 1:20(w/w) 비율에서 트립신 (Promega, cat# V5111) 또는 Lys-C (Roche, cat# 11 047 825 001)로 분해시킨다. 분해물을 1 mL의 1 N HCl로 켄칭시킨다. 질량 분광측정기 검출을 사용한 펩타이드 맵핑을 위해 40ml의 분해물을, Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용한 C18 칼럼상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RPHPLC)에 의해 분리한다(Vydac, cat# 218TP51, S/N NE 9606 10.3.5). 펩타이드 분리는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 물중의 0.02% TFA, 0.08% FA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.02% TFA 및 0.08% FA)를 사용하여 수행한다. API QSTAR 펄스 i 질량 분광측정기를 4.5k볼트 분무 전압 및 질량 대 하전비가 800 내지 2500인 스캔 범위에서 양성 모드로 작동시킨다.

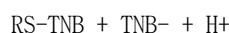
[0601] **디설파이드 결합 맵핑**

[0602] 항체를 변성시키기 위해, 100 mL의 항체를 100mM의 중탄산암모늄 중의 300ml의 8M 구아니딘과 혼합한다. pH가 7 내지 8이 되도록 조사하고 샘플을 6M 구아니딘 HCl의 최종 농도에서 실온에서 15분동안 변성시킨다. 변성된 샘플의 일부(100mL)를 Milli-Q 물로 600ml로 희석시켜 최종 구아니딘-HCl 농도가 1M이 되게한다. 샘플(220 mg)을 대략 16시간동안 37℃에서 1:50 트립신 또는 1:50 Lys-C: 항체(w/w) 비율(4.4mg 효소: 220mg 샘플)에서 트립신 (Promega, cat # V5111, lot# 22265901) 또는 Lys-C (Roche, cat# 11047825001, lot# 12808000)를 사용하여 분해시킨다. 추가 5mg의 트립신 또는 Lys-C를 샘플에 첨가하고 37℃에서 추가로 2시간동안 분해가 진행되도록 한다. 분해는 1mg의 TFA를 각각의 샘플에 첨가함에 의해 종료시킨다. 분해된 샘플은 Agilent HPLC 시스템상에서 C18 칼럼을 사용하는 RPHPLC(Vydac, cat# 218TP51 S/N NE020630-4-1A)에 의해 분리한다. 당해 분리는 분당 50ml의 유속으로 이동상 A(HPLC 등급 물중의 0.02% TFA, 0.08% FA) 및 이동상 B (아세트니트릴중의 0.02% TFA 및 0.08% FA)를 사용하는 펩타이드 맵핑을 위해 사용되는 동일한 농도 구배로 수행한다. HPLC 작동 조건은 펩타이드 맵핑을 위해 사용되는 것들과 동일하다. API QSTAR 펄스 i 질량 분광측정기는 4.5k볼트 분무 전압 및 800 내지 2500 질량 대 하전 비율의 스캔 범위에서 양성 모드로 작동시킨다. 디설파이드 결합은 펩타이드의 관찰된 MW와 디설파이드 결합에 의해 결합된 트립신 또는 Lys-C 펩타이드의 예측된 MW를 일치시켜 할당한다.

[0603] **유리된 설프하이드릴 측정**

[0604] 항체에서 유리된 시스테인을 정량하기 위해 사용되는 방법은 특징적인 발색단 생성물, 5-티오-(2-니트로벤조산) (TNB)을 유발하는 설프하이드릴 그룹(SH)과 엘만 시약, 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산) (DTNB)의 반응을 기초로 한다. 반응은 하기의 식에서 설명된다:

[0605] DTNB + RSH →



[0606] TNB-의 흡광도는 Cary 50 분광측정기를 사용하여 412nm에서 측정한다. 흡광도 곡선은 유리된 SH 표준물로서 2-머캅토에탄올(b-ME)의 희석물을 사용하여 플롯팅하고 단백질내 유리된 설프하이드릴 그룹의 농도는 샘플의 412nm에서의 흡광도로부터 측정한다.

[0607] b-ME 표준 스톡은 HPLC 등급의 물로 14.2M b-ME를 최종 농도 0.142mM로 연속 희석시켜 제조한다. 이어서 각각의 농도에 대해 3회 표준물을 제조한다. 항체는 아미콘 울트라 10,000 MWCO 원심분리 여과기(Millipore, cat# UFC801096, lot# L3KN5251)를 사용하여 10mg/ml로 농축시키고 완충액을 아달리무마브용 제제 완충액(5.57 mM 1염기성 인산나트륨, 8.69 mM 2염기성 인산나트륨, 106.69 mM NaCl, 1.07 mM 나트륨 시트레이트, 6.45 mM 시트르산, 66.68 mM 만니톨, pH 5.2, 0.1% (w/v) Tween)으로 대체시킨다. 당해 샘플을 20분동안 실온에서 진탕기상에서 혼합한다. 이어서 180 mL의 100 mM Tris 완충액, pH 8.1을 각각의 샘플 및 표준물에 첨가하고 이어서 10mM

인산 완충액(pH 8.1)중의 2mM DTNB의 300ml를 첨가한다. 완전히 혼합한 후, 샘플 및 표준물을 Cary 50 분광측정기상의 412nm에서의 흡광도에 대해 측정한다. 표준 곡선은 b-ME 표준물의 유리된 SH의 양 및 OD<sub>412</sub>을 플롯팅함에 의해 수득한다. 샘플의 유리된 SH 함량은 블랭크 공제 후 당해 곡선을 기준으로 계산한다.

[0608] **약 양이온 교환 크로마토그래피**

[0609] 항체는 10 mM 인산나트륨, pH 6.0을 사용하여 0.1mg/ml로 희석시킨다. 하전 이중성은 WCX-10 ProPac 분석 칼럼(Dionex, cat# 054993, S/N 02722)을 갖는 시마즈 HPLC 시스템을 사용하여 분석한다. 당해 샘플은 80% 이동상 A(10mM 인산나트륨, pH 6.0) 및 20% 이동상 B(10mM 인산나트륨, 500mM NaCl, pH 6.0)중에서 칼럼상으로 로딩하고 분당 1.0ml의 유속으로 용출시킨다.

[0610] **올리고사카라이드 프로파일링**

[0611] 항체의 PNGase F 처리 후 방출된 올리고사카라이드는 2-아미노벤즈아미드 (2-AB) 표지화 시약을 사용하여 유도체화한다. 형광 표지된 올리고사카라이드를 정상의 고성능 액체 크로마토그래피(NPHPLC)로 분리하고 사이한 형태의 올리고사카라이드를 공지된 표준물과의 체류시간 비교를 기초로 특징 분석한다.

[0612] 항체를 먼저 PNGaseF로 분해시켜 중쇄의 Fc 부분으로부터 N-연결된 올리고사카라이드를 절단한다. 당해 항체(200 mg)를 2 mL의 PNGase F 및 3 mL의 10% N-옥틸글루코시드와 함께 500mL의 에펜도르프 튜브에 첨가한다. 인산 완충식염수를 첨가하여 최종 용적이 60ml이 되게한다. 당해 샘플을 700RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기중에서 37℃에서 밤새 항온처리한다. 아달리무마브 로트 AFPO4C는 또한 대조군으로서 PNGase F로 분해시킨다.

[0613] PNGase F 처리 후, 샘플은 750RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기에서 5분동안 95℃에서 항온처리하고 단백질을 침출시킴에 이어서 샘플을 2분동안 10,000 RPM에서 에펜도르프 원심분리기에 놓고 침전된 단백질을 침강시킨다. 올리고사카라이드를 함유하는 상등액을 500ml 에펜도르프 튜브로 옮기고 65℃에서 스피드-백에서 건조시킨다.

[0614] 올리고사카라이드를 제조원(Prozyme (cat# GKK-404, lot# 132026))으로부터 구입한 2AB 표지화 키트를 사용하여 2AB로 표지시킨다. 표지 시약은 제조업자의 지침에 따라 제조한다. 아세트산(150 mL, 키트로 제공됨)을 DMSO 바이알(키트로 제공됨)에 첨가하고 용액을 피펫팅으로 수회 상승 하강시켜 혼합한다. 아세트산/DMSO 혼합물(100 mL)을 사용 직전에 2-AB 염료 바이알에 옮기고 염료가 완전히 용해될때까지 혼합한다. 이어서 염료 용액을 환원제의 바이알(키트로 제공됨)에 첨가하고 잘 혼합한다(표지화 시약). 표지화 시약(5 mL)을 각각의 건조된 올리고사카라이드 샘플 바이알에 첨가하고 완전히 혼합한다. 당해 반응 바이알을 반응 2시간동안 65℃에서 및 700 내지 800 RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기에 놓는다.

[0615] 표지화 반응 후, 과량의 형광 염료를 제조원(Prozyme (cat# GKI -4726))으로부터 글리코클린 에스 카트릿지를 사용하여 제거한다. 샘플을 첨가하기 전에, 카트릿지를 1 m의 밀리-Q 물로 세척하고 이어서 1ml의 30% 아세트산 용액으로 5회 세척한다. 샘플 첨가하기 직전에, 1 mL의 아세토니트릴(Burdick and Jackson, cat# AH015-4)을 카트릿지에 첨가한다.

[0616] 모든 아세토니트릴이 카트릿지를 통과한 후, 샘플을 새로이 세척된 디스크 의 중앙에 점적하고 10분동안 디스크 상으로 흡수되도록 한다. 디스크를 1ml의 아세토니트릴로 세척함에 이어서 96% 아세토니트릴 1ml로 5회 세척한다. 카트릿지를 1.5mL 에펜도르프 튜브상에 놓고 2-AB 표지된 올리고사카라이드를 밀리 Q 물로 3회 세척(각 세척당 400ml)으로 용출시킨다.

[0617] 올리고사카라이드를 시마즈(Shimadzu) HPLC 시스템에 연결된 Glycosep N HPLC (cat# GKI-4728) 칼럼을 사용하여 분리한다. 시마즈 HPLC 시스템은 시스템 조절자, 탈기 장치, 이원 펌프, 샘플 냉각기가 있는 자동샘플채취기 및 형광 검출기로 이루어진다.

[0618] **승온에서의 안정성**

[0619] 항체 완충액은 Amicon 초원심분리 여과기를 사용하는 5.57 mM 1염기성 인산나트륨, 8.69 mM 2염기성 인산나트륨, 106.69 mM NaCl, 1.07 mM 나트륨 시트레이트, 6.45 mM 시트르산, 66.68 mM 만니톨, 0.1% (w/v) Tween, pH 5.2; 또는 10 mM 히스티딘, 10 mM 메티오닌, 4% 만니톨, pH 5.9이다. 항체의 최종 농도는 적당한 완충액으로 2 mg/mL로 조정한다. 항체 용액은 이어서 여과 멸균하고 0.25 mL의 적정액을 멸균 조건하에 제조한다. 적정액을 1, 2 또는 3주동안 -80℃, 5℃, 25℃, 또는 40℃에서 방치한다. 항온처리 기간 말기에, 샘플은 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE로 분석한다.

- [0620] 안정성 샘플은 환원 및 비환원 조건하에 SDS-PAGE로 분석한다. 사용되는 과정은 본원에 기재된 바와 동일하다. 당해 겔은 콜로이드성 블루 염색(Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016)으로 염색시키고 배경이 청명해질때까지 Milli-Q 물로 탈염색시킨다. 염색된 겔을 이어서 Epson Expression 스캐너(model 1680, S/N DASX003641)를 사용하여 스캔한다. 보다 높은 민감성을 획득하기 위해, 동일한 겔을 실버 염색 키트 (Owl Scientific)를 사용하여 염색하고 제조업자에 의해 추천된 과정을 사용한다.
- [0621] **실시예 1.2.2.3.C: 사람화된 모노클로날 항체 그 자체 또는 화학치료요법과의 조합의 사람 암종 이종이식체의 성장에 대한 효능**
- [0622] 사람 암 세포는 조직 배양 플라스크에서 시험관내에서 99% 생존성, 85% 컨플루언스때까지 성장시킨다. 19 내지 25g의 SCID 암컷 또는 수컷 마우스의 귀에 태그하고 먼도시킨다. 이어서 0일째에 마우스의 오른쪽 옆구리에 0.2ml의  $2 \times 10^6$  사람 종양 세포 (1:1 매트릭셀)을 피하 접종하였다. 비히클(PBS), 사람화된 항체 및/또는 화학 치료제의 투여(IP, Q3D/주)는 마우스를 평균 종양 용적이 대략 150 내지 200 mm<sup>3</sup>인 마우스의 별도의 케이지에 크기별로 일치시킨 후 개시하였다. 접종 후 대략 10일째에 개시하여 1주일에 2회 한쌍의 캘리포로 측정하고 종양 용적은 수학식  $V = L \times W^2/2$  (V: 용적, mm<sup>3</sup>; L: 길이, mm; W: 너비, mm)에 따라 계산하였다. 종양 용적의 감소는 비히클 또는 이소스타입 대조군 mAb만을 투여받은 동물에서의 종양과 비교하여 mAb 단독 또는 화학치료요법과 조합된 mAb로 처리된 동물에서 나타난다.
- [0623] **실시예 1.2.2.3.D: FACS 기본 제지시킨 세포독성(rCTL) 분석**
- [0624] 사람 CD3+ T 세포는 음성 선별 집적 칼럼(R&D Systems, Minneapolis, MN; Cat.#HTCC-525)에 의해 이전에 동결된 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분리한다. T 세포는 D-PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA)중의 10 μg/mL 항-CD3 (OKT-3, eBioscience, Inc., San Diego, CA) 및 2 μg/mL 항-CD28 (CD28.2, eBioscience, Inc., San Diego, CA)로 피복된 플라스크(vent cap, Corning, Acton, MA)에서 4일동안 자극시키고 L-글루타민, 55mM β-ME, Pen/Strep, 10% FBS를 갖는 완전 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)중의 30U/mL IL-2 (Roche)에서 배양한다. T 세포는 이어서 분석에 사용하기 전에 30U/mL IL-2에서 밤새 방치시킨다. DoHH2 또는 Raji 표적 세포는 제조업자의 지침에 따라 PKH26 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)로 표지시킨다. L-글루타민 및 10% FBS(Hy clone, Logan, UT)를 함유하는 RPMI 1640 배지(페놀 부제, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 rCTL 분석 전반에 걸쳐 사용한다(문헌참조: See Dreier et al. (2002) Int J Cancer 100:690).
- [0625] 이펙터 T 세포 (E) 및 표적 (T)은 각각 96웰 플레이트 (Costar #3799, Acton, MA)에서 웰당  $10^5$  및  $10^4$ 의 최종 세포 농도로 플레이팅하여 E:T비가 10:1이 되도록 한다. DVD-Ig 분자를 희석하여 농도 의존적 적정 곡선을 수득한다. 밤새 항온처리 후 세포를 펠렛화하고 D-PBS중의 0.1% BSA(Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.1% 아지드화나트륨 및 0.5 μg/mL 프로피듐 요오다이드(BD)를 함유하는 FACS 완충액중에 재현탁시키기 전에 D-PBS로 1회 세척한다. FACS 데이터를 FACS Canto II 기계 (Becton Dickinson, San Jose, CA)상에서 수집하고 Flowjo (Treestar)에서 분석하였다. % 총 표적(대조군, 무처리)으로 나눈 DVD-Ig 처리된 샘플내 % 생존 표적을 계산하여 % 특이적 용해를 측정한다. IC50은 Prism (Graphpad)에서 계산한다.
- [0626] **실시예 1.2.2.3.E: 항체-의존 세포 매개 세포독성 (ADCC) 방법**
- [0627] 표적 (DoHH2, A431 및 U87MGde2-7) 세포를 수확하고, 10 mL의 RPMI 무 페놀 레드 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat.#11835)로 세척한 다음, 칼세인-AM (eBioscience, San Diego, CA, Cat.#65-0853)중에서  $4 \times 10^6$  세포/mL의 농도로 30분간 배양하였다. 표적 세포를 10 mL의 RPMI 무 페놀 레드 배지 10% FBS (Thermo Scientific HyClone, Logan, UT, Cat.#SH30070.03)으로 3회 세척하고, 96-웰 환저 평판에 180,000 세포/웰로 분취하였다. 항체 및 DVD-Ig를 RPMI 무 페놀 레드 10% FBS중에 10 μg/mL로 희석하였다. 표적 세포로부터 상청액을 제거하고 30 μl/웰의 희석 항체 및 DVD-Ig를 첨가하였다. 세포를 빙상에서 1시간 배양한 다음 150 μl/웰의 RPMI 무 페놀 레드 10% FBS로 3회 세척하였다. 세포를 2 mL 검정 블록으로 옮기고  $1.33 \times 10^5$  세포/mL의 농도로 재현탁하였다. 불활성화된 사람 NK 세포 (Astarte Biologics, Redmond, WA, Cat.#1027) 또는 활성화된 사람 NK 세포 (2주간 키트를 사용하여 활성화된 사내 헌혈자 프로그램 PBMC, Myltenyi Biotech, Auburn, CA, Cat.#130-094-483)를 해동하고, 10 mL의 RPMI 무 페놀 레드 10% FBS로 2회 세척한 후,  $1.2 \times 10^6$  세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서, 75 μl의 NK 세포와 75 μl의 표적 세포를 동일한 웰로 옮김으로써 NK 세포 및 표적 세포를 96-웰 V형 평판에 9:1의 비율로 분취하였다. 웰에 NK 세포 대신에 배지를 첨가하고 이를 사용하여 자연적인 칼세인-AM 방출을 결정하였

다. 웰에 NK 세포 대신에 2% 트리톤 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Cat.#93443)을 첨가하고, 이를 사용하여 용해 전체량을 결정하였다. 모든 조건은 3회 반복하였다.

[0628] 세포를 37℃에서 2 내지 2.5 시간 동안 배양한 다음, 1300 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100  $\mu$ l/웰의 상청액을 블랙 클리니플레이트로 옮겼다. 평판을 2103 EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA)로 관독하였다.

[0629] 표 7, 8 및 9는 DVD-Ig의 ADCC 활성을 보여준다.

표 7

불활성화된 NK 세포 이펙터, DOHH 표적 세포를 이용한 DVD-Ig를 함유하는 NKG2D의 ADCC 활성

| DVD ID                                | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | % 특이적 용해 | SD    |
|---------------------------------------|------------------|------------------|----------|-------|
| DVD1052                               | NKG2D            | CD-20            | 6.0      | ± 2.1 |
| DVD1053                               | CD-20            | NKG2D            | 25.1     | ± 1.4 |
| DVD1054                               | NKG2D            | CD19             | 14.9     | ± 1.5 |
| DVD1055                               | CD19             | NKG2D            | 8.3      | ± 2.5 |
| 비관련 DVD1060                           | NKG2D            | Her-2            | 5.6      | ± 4.7 |
| CD-20 (Rituxan®, IDE/Genentech/Roche) |                  |                  | 26.3     | ± 1.1 |
| Ab 없음                                 |                  |                  | 5.9      | ± 1.1 |

[0630]

[0631] N-말단 또는 C-말단 위치에 NKG2D 유래의 VD를 함유하는 DVD-Ig 모두는 ADCC 활성을 나타냈다.

표 8

활성화된 NK 세포 이펙터, A431 표적 세포를 이용한 DVD-Ig를 함유하는 NKG2D의 ADCC 활성

| DVD ID                 | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | % 특이적 용해 | SD    |
|------------------------|------------------|------------------|----------|-------|
| DVD1056                | NKG2D            | EGFR             | 47.9     | ± 1.9 |
| DVD1057                | EGFR             | NKG2D            | 52.4     | ± 0.4 |
| 비관련 DVD1052            | NKG2D            | CD-20            | 33.4     | ± 1.6 |
| EGFR (Erbix®, Imclone) |                  |                  | 45.0     | ± 2.9 |
| Ab 없음                  |                  |                  | 24.9     | ± 1.2 |

[0632]

[0633] N-말단 또는 C-말단 위치에 NKG2D 유래의 VD를 함유하는 DVD-Ig 모두는 ADCC 활성을 나타냈다.

표 9

활성화된 NK 세포 이펙터, U87MGDE2-7 표적 세포를 이용한 DVD-Ig를 함유하는 NKG2D의 ADCC 활성

| DVD ID      | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | % 특이적 용해 | SD    |
|-------------|------------------|------------------|----------|-------|
| DVD1214     | NKG2D            | EGFR             | 45.4     | ± 2.7 |
| DVD1215     | EGFR             | NKG2D            | 52.2     | ± 1.5 |
| 비관련 DVD1052 | NKG2D            | CD-20            | 33.4     | ± 1.6 |
| EGFR        |                  |                  | 50.1     | ± 2.5 |
| Ab 없음       |                  |                  | 24.9     | ± 1.2 |

[0634]

[0635] N-말단 또는 C-말단 위치에 NKG2D 유래의 VD를 함유하는 DVD-Ig 모두는 ADCC 활성을 나타냈다.

[0636] 실시예 1.2.2.3.F: FcR 결합 방법

[0637] 세포 (FcRn: FcRnGPI-CHO, FcγRI: THP-1, FcγRIIa: K562, FcγRIIb: CHO-FcγRII-b-1)를 96-웰 환저 평판에  $1 \times 10^5$  세포/웰로 적용하였다. 항체 및 DVD-Ig를 FACS 완충액 (FcRn 시료의 경우 pH 6.4, 나머지의 경우 pH 7.4의 PBS중 1% FBS)에 100 μg/ml로 희석하였다. 세포로부터 상청액을 제거하고 30 μl의 희석 항체 및 DVD-Ig를 웰에 첨가하였다. 세포를 항체와 함께 4℃에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 150 μl의 FACS 완충액 (FcRn 시료의 경우 pH 6.4, 나머지의 경우 pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 세포를 1:125 희석된 R-PE 결합된 항-사람 IgG F(Ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.#109-116-170)과 함께 50 μl의 FACS 완충액 (FcRn 시료의 경우 pH 6.4, 나머지의 경우 pH 7.4)에 재현탁시키고 4℃에서 40분간 배양하였다. 세포를 3회 세척하고 마지막으로 100 μl의 FACS 완충액 (FcRn 시료의 경우 pH 6.4, 나머지의 경우 pH 7.4)에 재현탁시켰다. 시료를 FACSCalibur 기기 (Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 분석하였다. 비-항체-처리된 대조 시료가 3의 GMFI를 갖도록 FL2에 대한 FACSCalibur 세팅을 조절하였다. 이어서, 실험 시료를 분석하였다. FlowJo 소프트웨어 (Treestar, Inc., Ashland, OR)를 사용하여 데이터를 분석하고 전방 및 측방 산란 게이트로 표시되는 생 세포에 대한 R-PE GMFI를 결정하였다.

[0638] 표 10은 DVD-Ig에 대한 Fc 수용체 결합을 보여준다.

표 10

DVD-Ig에 대한 Fc 수용체 결합

| 항체 또는 DVD-Ig                                  | Fc 수용체 결합 기하학적 평균 |       |         |         |
|-----------------------------------------------|-------------------|-------|---------|---------|
|                                               | FcRn (pH6.4)      | FcγRI | FcγRIIa | FcγRIIb |
| <b>2차, 단독</b>                                 | 6                 | 3     | 3       | 3       |
| EGFR (Erbix®), Imclone)                       | 31                | 101   | 3       | 1       |
| 225-LL-a/225-LL EGFR-IGF DVD-Ig               | 54                | 82    | 3       | 2       |
| 225-LL-a/225-SL EGFR-IGF DVD-Ig               | 103               | 93    | 4       | 9       |
| 225-SL-71592VH-225-SL-71592VL EGFR-IGF DVD-Ig | 109               | 90    | 4       | 12      |
| 225-SL-71592VH-225-LL-71592VL EGFR-IGF DVD-Ig | 66                | 87    | 4       | 4       |
| D2E7-SL-hu2B5.7                               | 253               | 159   | 13      | 66      |
| <b>2차, 단독</b>                                 | 5                 | 3     | 3       | 3       |
| EGFR (Erbix®), Imclone)                       | 14                | 67    | 3       | 3       |
| DVD015                                        | 28                | 66    | 3       | 3       |
| DVD016                                        | 55                | 83    | 5       | 6       |
| DVD021                                        | 14                | 71    | 4       | 3       |
| DVD022                                        | 21                | 118   | 18      | 4       |
| DVD023                                        | 31                | 66    | 3       | 5       |
| DVD024                                        | 218               | 104   | 8       | 63      |
| DVD025                                        | 10                | 84    | 3       | 3       |
| DVD026                                        | 11                | 3     | 3       | 3       |
| DVD035                                        | 27                | 75    | 4       | 4       |
| DVD036                                        | 7                 | 65    | 3       | 3       |
| AB005                                         | 315               | 148   | 11      | 71      |
| AB011                                         | 69                | 128   | 21      | 4       |
| AB012                                         | 25                | 74    | 4       | 4       |
| AB014                                         | 42                | 80    | 5       | 6       |
| AB033                                         | 8                 | 66    | 3       | 4       |

[0639]

[0640] N-말단 또는 C-말단 위치에 NKG2D 유래의 VD를 함유한 DVD-Ig 모두는 Fc 수용체 결합을 나타냈다.

[0641] 실시예 1.4: DVD-Ig의 생성

[0642] 2개의 항원에 결합하는 DVD-Ig 분자는 2개의 모 모노클로날 항체, 즉, 본원에 기재된 바와 같이 선별된 사람 항원 A에 대한 항체 및 사람 항원 B에 대한 다른 항체를 사용하여 작제한다.

[0643] 실시예 1.4.1: 2개의 링커 길이를 갖는 DVD-Ig의 생성

[0644] 234번, 및 235번에서 돌연변이를 갖는 1μl의 Fc를 포함하는 불변 영역은 ADCC/CDC 이펙터 기능을 제거하기 위해 사용한다. 4개의 상이한 항-A/B DVD-Ig 작제물을 생성한다: 2개는 짧은 링커(SL)를 갖고 2개는 긴 링커(LL)를 갖고, 각각은 2개의 상이한 도메인 배향: V<sub>A</sub>-V<sub>B</sub>-C 및 V<sub>B</sub>-V<sub>A</sub>-C으로 있다(표 11 참조). 사람 C1/Ck 또는 CH1 도메인의 N-말단 서열 유래의 링커 서열은 다음과 같다:

- [0645] DVDAB 작제물에 대해:
- [0646] 경쇄 (항-A가  $\lambda$ 를 갖는 경우): 짧은 링커: QPKAAP (서열번호 15); 긴 링커: QPKAAPSVTLFPP (서열번호 16)
- [0647] 경쇄(항-A가  $\kappa$ 를 갖는 경우): 짧은 링커: TVAAP (서열번호 13); 긴 링커: TVAAPSVFIFPP (서열번호 14)
- [0648] 중쇄 ( $\gamma 1$ ): 짧은 링커: ASTKGP (서열번호 21); 긴 링커: ASTKGPSVFPLAP (서열번호 22)
- [0649] DVDBA 작제물에 대해:
- [0650] 경쇄(항-B가  $\lambda$ 를 갖는 경우): 짧은 링커: QPKAAP (서열번호 15); 긴 링커: QPKAAPSVTLFPP (서열번호 16)
- [0651] 경쇄(항-B가  $\kappa$ 를 갖는 경우): 짧은 링커: TVAAP (서열번호 13); 긴 링커: TVAAPSVFIFPP (서열번호 14)
- [0652] 중쇄 ( $\gamma 1$ ): 짧은 링커: ASTKGP (서열번호 21); 긴 링커: ASTKGPSVFPLAP (서열번호 22)
- [0653] 중쇄 및 경쇄 작제물은 pBOS 발현 벡터에 서브클로닝하고 COS 세포에서 발현시킴에 이어서 단백질 A 크로마토그래피로 정제한다. 정제된 물질은 SDS-PAGE 및 SEC 분석에 적용한다.
- [0654] 표 11은 각각 항-A/B DVD-Ig 단백질을 발현하기 위해 사용되는 중쇄 및 경쇄를 기재한다.

## 표 11

**항-A/B DVD-Ig 작제물**

| DVD-Ig 단백질 | 중쇄 작제물     | 경쇄 작제물     |
|------------|------------|------------|
| DVDABSL    | DVDABHC-SL | DVDABLC-SL |
| DVDABLL    | DVDABHC-LL | DVDABLC-LL |
| DVDBASL    | DVDBAHC-SL | DVDBALC-SL |
| DVDBALL    | DVDBAHC-LL | DVDBALC-LL |

- [0655]
- [0656] 실시예 1.4.2: DVDABSL 및 DVDABLL에 대한 DNA 작제물의 분자 클로닝:
- [0657] 중쇄 작제물 DVDABHC-LL 및 DVDABHC-SL를 제조하기 위해, A 항체의 VH 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; B 항체의 VH 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 재조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hC $\gamma 1, z$  비-a 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다.
- [0658] 경쇄 작제물 DVDABLC-LL 및 DVDABLC-SL를 제조하기 위해, A 항체의 VL 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; B 항체의 VL 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 표준 PCR 조건하에서 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 재조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hC $\kappa$  포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다. 유사한 방법을 사용하여 하기에 기재된 바와 같은 DVDBASL 및 DVDBALL을 제조한다:
- [0659] 실시예 1.4.3: DVDBASL 및 DVDBALL에 대한 DNA 작제물의 분자 클로닝
- [0660] 중쇄 작제물 DVDBAHC-LL 및 DVDBAHC-SL를 제조하기 위해, B 항체의 VH 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; A 항체의 VH 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 표준 PCR 조건을 사용하여 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성

제조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hCg1,z 비-a 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다.

[0661] 경쇄 작제물 DVDBALC-LL 및 DVDBALC-SL를 제조하기 위해, B 항체의 VL 도메인을 특이적 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 PCR 증폭시키고; A 항체의 VL 도메인은 특이적 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대해 짧은/긴 링커 서열을 포함한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 물다는 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물은 겔 정제하고 표준 PCR 조건을 사용하여 후속 중첩 PCR 반응에 대해 중첩 주형으로서 함께 사용한다. 중첩 PCR 생성물은 표준 상동성 제조합 방법을 사용함에 의해 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hCk 포유동물 발현 벡터(Abbott)에 서브클로닝한다.

[0662] **실시예 1.4.4: 추가 DVD-Ig의 작제 및 발현**

[0663] **실시예 1.4.4.1: DVD-Ig 벡터 작제물의 제조**

[0664] DVD-Ig로의 혼입을 위한, 특이적 항원 또는 이의 에피토프를 인지하는 특이적 항체에 대한 모 항체 아미노산 서열은 상기된 바와 같이 하이브리도마를 제조함에 의해 수득될 수 있거나 공지된 항체 단백질을 또는 핵산을 서열 분석함에 의해 수득될 수 있다. 추가로 공지된 서열은 문헌으로부터 수득될 수 있다. 당해 서열은 세포에서의 발현을 위해 표준 DNA 합성 또는 증폭 기술을 사용하여 핵산을 합성하고 목적하는 항체 단백을 발현 벡터로 어셈블리하기 위해 사용될 수 있다.

[0665] 예를 들어, 핵산 코돈은 아미노산 서열로부터 측정하고 올리고뉴클레오타이드 DNA는 제조원(Blue Heron Biotechnology, Inc.(www.blueheronbio.com) Bothell, WA USA)에 의해 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드는 플라스미드 벡터에 클로닝되고 서열 입증된 300 내지 2,000 염기쌍 이본체 DNA 단편으로 어셈블리하였다. 클로닝된 단편은 효소 과정을 사용하여 어셈블리하여 완전한 유전자를 수득하고 발현 벡터에 서브클로닝한다(문헌참조: 7,306,914; 7,297,541 ; 7,279,159; 7,150,969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643).

[0666] pHybE 벡터 그룹(US 특허원 제61/021,282호)은 모 항체 및 DVD-Ig 클로닝을 위해 사용하였다. pJP183로부터 유래된 V1; pHybE-hCg1,z,non-a V2는 야생형 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 중쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP191로부터 유래된 V2; pHybE-hCk V2는 카파 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 경쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP192로부터 유래된 V3; pHybE-hC1 V2는 람다 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 경쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. 람다 시그널 펩타이드 및 카파 불변 영역으로 구성된 V4는 람다-카파 하이브리드 V 도메인을 갖는 DVD 경쇄 클로닝을 위해 사용하였다. 카파 시그널 펩타이드 및 람다 불변 영역으로 구성된 V5는 카파-람다 하이브리드 V 도메인을 갖는 DVD 경쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP183로부터 유래된 V7; pHybE-hCg1,z,non-a V2는 (234, 235 AA) 돌연변이 불변 영역을 갖는 항체 및 DVD 중쇄의 클로닝을 위해 사용하였다.

[0667] **실시예 1.4.4.2: 293 세포에서의 형질감염 및 발현**

[0668] DVD-Ig 단백질의 생성을 위해 DVD-Ig 벡터 작제물로 293 세포를 형질감염시켰다. 사용된 293 일시적 형질감염 절차는 Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30(2):E9 및 Pham et al. (2005) Biotech. Bioengineering 90(3):332-44에 공개된 방법을 변형한 것이다. 형질감염에 사용된 시약은 다음의 것을 포함한다:

[0669] ● 130 rpm, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>로 설정한 가습 배양기에서 일회용 Erlenmeyer 플라스크에 배양된 HEK 293-6E 세포(EBNA1을 안정하게 발현하는 사람 배아 신장 세포주; National Research Council Canada로부터 입수).

[0670] ● 배양 배지: 25 µg/mL의 제네티신 (G418)(Invitrogen 10131-027) 및 0.1% Pluronic F-68 (Invitrogen 24040-032)를 함유한 프리스타일 293 발현 배지 (Invitrogen 12338-018).

[0671] ● 형질감염 배지: 10 mM HEPES (Invitrogen 15630-080)을 함유한 프리스타일 293 발현 배지.

[0672] ● 폴리에틸렌민 (PEI) 스톡: 선형 25 kDa PEI (Polysciences)로 제조되어 -15°C 미만에서 저장된 pH 7.0의 1 mg/mL 멸균 스톡 용액.

- [0673] ● 트립톤 공급 배지: 프리스타일 293 발현 배지중의 트립톤 N1 (Organotechnie, 19554)의 5% w/v 멸균 스톱.
- [0674] 형질감염을 위한 세포 제제: 형질감염 약 2 내지 4 시간 전에, HEK 293-6E 세포를 원심분리하여 수확하고 배양 배지에 mL 당 약 백만 생세포의 세포 밀도로 재현탁시킨다. 각각의 형질감염시, 40 mL의 세포 현탁액을 일회용 250 mL Erlenmeyer 플라스크에 옮기고 2 내지 4 시간 동안 배양한다.
- [0675] 형질감염: 형질감염 배지 및 PEI 스톱을 실온(RT)으로 예열한다. 각각의 형질감염시 25  $\mu$ g의 플라스미드 DNA와 50  $\mu$ g의 폴리에틸렌이민 (PEI)를 5 mL의 형질감염 배지와 혼합하고 실온에서 15 내지 20분 동안 배양하여 DNA:PEI 복합체를 형성한다. BR3-Ig 형질감염을 위해, 25  $\mu$ g의 BR3-Ig 플라스미드를 형질감염마다 사용한다. 각 5 mL의 DNA:PEI 복합체 혼합물을 사전에 준비해 둔 40 mL의 배양액에 첨가하고 130 rpm, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>로 설정한 가습 배양기에 다시 넣는다. 20 내지 28 시간 후, 5 mL의 트립톤 공급 배지를 각 형질감염 배양액에 첨가하고 6일 동안 계속 배양한다.
- [0676] 표 12는 DVD-Ig의 발현 프로필을 보여준다.

표 12

합체 및 DVD-Ig를 함유하는 NKG2D의 일시적 HEK293 발현 수율

| DVD ID  | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | 발현 수율 (mg/L) |
|---------|------------------|------------------|--------------|
| AB121   | NKG2D (KYK-2.0)  |                  | 32.8         |
| DVD1052 | NKG2D            | CD-20            | 55.6         |
| DVD1053 | CD-20            | NKG2D            | 3.4          |
| DVD1054 | NKG2D            | CD-19            | 2.44         |
| DVD1055 | CD-19            | NKG2D            | 32.4         |
| DVD1056 | NKG2D            | EGFR             | 21.04        |
| DVD1057 | EGFR             | NKG2D            | 21.86        |
| DVD1060 | NKG2D            | Her2             | 23           |
| DVD1061 | Her2             | NKG2D            | 55.6         |
| DVD1214 | NKG2D            | EGFR             | 38.4         |
| DVD1215 | EGFR             | NKG2D            | 19.6         |

- [0677]
- [0678] 모든 DVD-Ig는 293 세포에서 잘 발현하였다. DVD-Ig는 단백질 A 칼럼에 대해 용이하게 정제될 수 있다. 대부분의 경우, >5 mg/L 정제된 DVD-Ig는 293 세포의 상등액으로부터 용이하게 수득될 수 있다.
- [0679] 실시예 1.4.5: A/B DVD-Ig의 특성 분석 및 선두 선별
- [0680] 항-A/B DVD-Ig의 결합 친화성은 단백질 A 및 단백질 B 둘다에 대해 분석한다. DVD-Ig의 4가 성질은 바이어코어 상의 다중 결합 연구에 의해 조사한다. 한편, 단백질 A 및 단백질 B에 대한 DVD-Ig의 중화성 효능은 각각 본원에 기재된 바와 같이 생분석에 의해 평가한다. 본래의 모 mAb의 친화성 및 효능을 최상으로 보유하는 DVD-Ig 분자는 각각 mAb에 대해 본원에 기재된 바와 같이 면밀한 물리화학적 및 생분석적(랫트 PK) 특성 분석을 위해 선별한다. 일련의 분석을 기초로, 최종 선두 DVD-Ig는 CHO 안정한 세포주 개발 단계로 진행시키고 CHO-유래 물질은 시노물구스 원숭이 및 및 예비 제형 활성에서 안정성, 약리역학적 및 효능 연구에 사용한다.
- [0681] 실시예 2: 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig)의 생성 및 특징 분석
- [0682] 공지된 아미노산 서열을 갖는 모 항체를 사용하는 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig)은 DVD-Ig 가변 중쇄 및 DVD-Ig 가변 경쇄 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 합성하고 당해 단편을 실시예 1.4.4.1에 따라 pHybC-D2 벡터로 클로닝하여 제조하였다. DVD-Ig 작제물을 실시예 1.4.4.2에 기재된 바와 같이 클로닝시키고 293 세포에서 발현시켰다. DVD-Ig 단백질은 표준 방법에 따라 정제하였다. 기능적 특성 분석은 지적된 바와 같이 실시예 1.1.1 및 1.1.2에 기재된 방법에 따라 측정하였다. 본 발명의 DVD-Ig에 대한 DVD-Ig VH 및 VL 채는 하기에 제공된다.
- [0683] 실시예 2.1: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 CD-20 DVD-Ig의 생성

표 13

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 50       | <b>DVD1052H</b>  | AB121VH         | AB001VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDC<br>TYFDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> QVQLQQ<br>PGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP<br>GRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSS<br>STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW<br>GAGTITVTVSA |
| 51       | <b>DVD1052L</b>  | AB121VL         | AB001VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFGSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGT<br>KLTVL <b>QPKAAPSVTLFPP</b> QIVLSQSPAILSPSPG<br>EKVTMTCRASSSVSYIHWFGQKPGSSPKPWIYATS<br>NLASGVPRVRFSGSGSGTSYSLTISRVEADAATYY<br>CQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR                                                                        |
| 52       | <b>DVD1053H</b>  | AB001VH         | AB121VH         | QVQLQQPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH<br>WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL<br>TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD<br>WYFNVWGAGTITVTVSA <b>ASTKGPSVFPLAP</b> QVQLVE<br>SGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP<br>KGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDTYFDYW<br>GQGTITVTVSS                                           |
| 53       | <b>DVD1053L</b>  | AB001VL         | AB121VL         | QIVLSQSPAILSPSPGKVTMTCRASSSVSYIHWFG<br>QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSY<br>SLTISRVEADAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI<br>KR <b>TVAAPSVFIFPP</b> QSALTQPASVSGSPGQSITIS<br>CSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPS<br>SGVSDRFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAA<br>WDDSLNGPVFGGGTCLTVLG                                                                          |

[0684]

[0685] 실시예 2.2: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 CD-19(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 14

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 54       | <b>DVD1054H</b>  | AB121VH         | AB006VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDC<br>TYFDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> QVQLQQ<br>SGAEELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRP<br>QGQLEWIGQIWPNGDGTNYNGKFKGKATLTADESS<br>STAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYAM<br>DYWGQGTITVTVSS |
| 55       | <b>DVD1054L</b>  | AB121VL         | AB006VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFGSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGT<br>KLTVL <b>QPKAAPSVTLFPP</b> DILLTQTASLAVSLG<br>QRATISCKASQSDYDGDSTYLNWYQIIPGQPPKLL<br>IYDASNLVSGIPRFGSGSGSGTDFTLNIHPVEKVD<br>AATYHCQSTEDPWTFGGGTKLEIKR                                                                      |
| 56       | <b>DVD1055H</b>  | AB006VH         | AB121VH         | QVQLQQSGAEELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMN<br>WVKQRPQGQLEWIGQIWPNGDGTNYNGKFKGKATL<br>TAEDESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVG<br>RYYAMDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> QVQ<br>LVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR<br>QAPCKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISR<br>NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDTYF<br>DYWGQGTITVTVSS                                        |
| 57       | <b>DVD1055L</b>  | AB006VL         | AB121VL         | DILLTQTASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDST<br>YLNWYQIIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPRFGSGSG<br>SGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQSTEDPWTFGG<br>GTKLEIKR <b>TVAAPSVFIFPP</b> QSALTQPASVSGSPGQ<br>SITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYY<br>DDLPSGVSDRFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEAD<br>YYCAAWDDSLNGPVFGGGTCLTVLG                                                                     |

[0686]

[0687] 실시예 2.3: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 EGFR(서열 2) DVD-Ig의 생성

표 15

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 58       | <b>DVD1056H</b>  | AB121VH         | AB033VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGD<br>TYFDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFFLAPQ</b> VQLKQ<br>SGPCLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGWHWVRQSP<br>GKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS<br>QVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQ<br>GTLVTVSA |
| 59       | <b>DVD1056L</b>  | AB121VL         | AB033VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFGSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFVGGGT<br>KLTVLG <b>QPKAAPSVTLFPPD</b> ILLTQSPVILSVSPG<br>ERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYA<br>SESISGIPSRFGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY<br>YCOQNNNWPTTFGAGTKLELKR                                                                |
| 60       | <b>DVD1057H</b>  | AB033VH         | AB121VH         | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVH<br>WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSIN<br>KDNSKQSVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEF<br>FAYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFFLAPQ</b> VQLVESG<br>GGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK<br>GLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNT<br>LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGTIFYDYWGQ<br>GTTVTVSS                                        |
| 61       | <b>DVD1057L</b>  | AB033VL         | AB121VL         | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW<br>YQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFGSGSGTD<br>FTLSINSVESEDIADYYCOQNNNWPTTFGAGTKLE<br>LKR <b>TVAAPSVFIFPP</b> QSALTQPASVSGSPGQSITI<br>SCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDL<br>PSGVSDRFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCA<br>AWDDSLNGPVFVGGGTKLTVLG                                                                 |

[0688]

[0689]

실시예 2.4: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 EGFR(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 16

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 62       | <b>DVD1058H</b>  | AB121VH         | AB003VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGD<br>TYFDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFFLAPQ</b> VQLQE<br>SGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSSVSGDYWTWIRQ<br>SPGKLEWIGHIYSGNTNYPNLSKRLTISIDTS<br>KTQFSLKSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQ<br>GTMVTVSS |
| 63       | <b>DVD1058L</b>  | AB121VL         | AB003VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFGSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFVGGGT<br>KLTVLG <b>QPKAAPSVTLFPPD</b> IQMTQSPSSLSASVG<br>DRVITTCQASQDISNYLNWYQKPKGAPKLLIYDA<br>SNLETGVPSPRFGSGSGTDFTFTISSLPEDIATY<br>FCQHFDHLPLAFGGGTKEIKR                                                                |
| 64       | <b>DVD1059H</b>  | AB003VH         | AB121VH         | QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSSVSGDY<br>WTWIRQSPGKLEWIGHIYSGNTNYPNLSKRLT<br>ISIDTSKTQFSLKSSVTAADTAIYYCVRDRVTGA<br>FDIWGQGTMTVTVSS <b>ASTKGPSVFFLAPQ</b> VQLVESG<br>GGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK<br>GLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNT<br>LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGTIFYDYWGQ<br>GTTVTVSS                                        |
| 65       | <b>DVD1059L</b>  | AB003VL         | AB121VL         | DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCQASQDISNYLNW<br>YQKPKGAPKLLIYDASNLETGVPSPRFGSGSGTD<br>FTFTISSLPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKEI<br>KR <b>TVAAPSVFIFPP</b> QSALTQPASVSGSPGQSITI<br>SCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDL<br>PSGVSDRFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCA<br>AWDDSLNGPVFVGGGTKLTVLG                                                                  |

[0690]

[0691]

실시예 2.5: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 HER 2(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 17

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 66       | <b>DVD1060H</b>  | AB121VH         | AB004VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGG<br>TYFDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> EVQLVE<br>SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP<br>GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK<br>NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWG<br>QGTITVTVSS |
| 67       | <b>DVD1060L</b>  | AB121VL         | AB004VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSGVSDFSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFVGSGT<br>KLTVL <b>QPKAAPSVTLFPP</b> DIQMTQSPSSLSASVG<br>DRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA<br>SFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCOQHYTTPPTFGQGTKVEIKR                                                                    |
| 68       | <b>DVD1061H</b>  | AB004VH         | AB121VH         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH<br>WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI<br>SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY<br>AMDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> QVQLVES<br>GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG<br>KGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSEN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGTIFYFDYWG<br>QGTITVTVSS                                       |
| 69       | <b>DVD1061L</b>  | AB004VL         | AB121VL         | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAW<br>YQQKPGKAPKLLIYSAFLYSGVPSRFSGSRSGTD<br>FTLTISSLQPEDFATYYCOQHYTTPPTFGQGTKVE<br>IKR <b>TVAAPSVFI</b> FPFQSALTQPASVSGSPGQSITI<br>SCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLL<br>PSGVSDFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCA<br>AWDDSLNGPVFVGSGTKLTVLG                                                                     |

[0692]

[0693]

실시예 2.6: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 IGF1R(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 18

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 70       | <b>DVD1062H</b>  | AB121VH         | AB011VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGG<br>TYFDYWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> EVQLLE<br>SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAP<br>GKGLEWVSAISGGSGTTFYADSVKGRFTISRDNSEN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYG<br>MDVWGQGTITVTVSS |
| 71       | <b>DVD1062L</b>  | AB121VL         | AB011VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSGVSDFSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFVGSGT<br>KLTVL <b>QPKAAPSVTLFPP</b> DIQMTQFPSSLSASVG<br>DRVITITCRASQGIKNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAA<br>SRLHRGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY<br>YCLQHNISYPCSFQGGTKLEIKR                                                                        |
| 72       | <b>DVD1063H</b>  | AB011VH         | AB121VH         | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN<br>WVRQAPGKGLEWVSAISGGSGTTFYADSVKGRFTI<br>SRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS<br>YYYYYGMVWGQGTITVTVSS <b>ASTKGPSVFPLAP</b> QV<br>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV<br>RQAPCKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGTIY<br>FDYWGQGTITVTVSS                                         |
| 73       | <b>DVD1063L</b>  | AB011VL         | AB121VL         | DIQMTQFPSSLSASVGDRVITITCRASQGIKNDLGW<br>YQQKPGKAPKRLIYAAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE<br>FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNISYPCSFQGGTKLE<br>IKR <b>TVAAPSVFI</b> FPFQSALTQPASVSGSPGQSITI<br>SCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLL<br>PSGVSDFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCA<br>AWDDSLNGPVFVGSGTKLTVLG                                                                       |

[0694]

[0695]

실시예 2.7: 링커 세트 1을 이용한 NKG2D 및 EGFR(서열 3) DVD-Ig의 생성

표 19

| 서열<br>번호 | DVD 가변<br>도메인 명칭 | 외부 가변<br>도메인 명칭 | 내부 가변<br>도메인 명칭 | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 74       | DVD1214H         | AB121VH         | AB064VH         | 12345678901234567890123456789012345<br>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMH<br>WVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGG<br>TYFDYWGQCTTVTVSS <b>ASTKGPSVFFLAP</b> QVQLQE<br>SGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSLSSDFAWNWRQP<br>PGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIISRDISK<br>NQFFFLKNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT<br>LTVSS |
| 75       | DVD1214L         | AB121VL         | AB064VL         | QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVN<br>WYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFGSGSKSGT<br>SAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGT<br>KLTVLG <b>QPKAAPSVTLFPP</b> DIQMTQSPSSMSVSVG<br>DRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHG<br>TNLDDGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY<br>YCVQYAQFPWFEGGGTKLEIKR                                                             |
| 76       | DVD1215H         | AB064VH         | AB121VH         | QVQLVESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSLSSDFAW<br>NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTII<br>SRDISKNQFFFLKNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY<br>WGQGTTLTVSS <b>ASTKGPSVFFLAP</b> QVQLVESGGGL<br>VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE<br>WVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLDGTYYFDYWGQGT<br>LTVSS                                       |
| 77       | DVD1215L         | AB064VL         | AB121VL         | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW<br>LQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFGSGSGTD<br>YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWFEGGGTKLE<br>IKR <b>TVAAPSVFIAPP</b> QSALTQPASVSGSPGQSITI<br>SCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDL<br>PSGVSDRFGSGSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCA<br>AWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG                                                                |

[0696]

[0697] 실시예 2.7: 모 항체 및 DVD-Ig 서열을 클로닝하는데 사용된 클로닝 벡터 서열

표 20

| 배터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|       |       | GGTTGTTGGTCCTCATATTACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAAATG<br>TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC<br>TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT<br>ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATAT<br>GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br>TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCATATG<br>CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG<br>TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT<br>CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT<br>AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA<br>TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG<br>GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT<br>CTGTATCCGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAAACATGAGA<br>ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTATTTATAGGTTAA<br>TGTCATGATAAATATGGTTCTTAGACGTGAGTGGCACTTTTCGGGGAAA<br>TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA<br>TCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG<br>GAAGAGTATAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCG<br>GGCATTTCGCTTCCGTGTTTTCGTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA<br>AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATCT<br>CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGCAAGAACGTTTTCCTAAT<br>GATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGA<br>CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTT<br>GGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACACT<br>AAGAGAAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA<br>CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGTGA<br>CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA<br>TGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCCAGATGCTGCGCAATGGC<br>AACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCG<br>GCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCT<br>GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG<br>TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC<br>CTCCGCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA<br>ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTA<br>ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCA<br>TTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGAC<br>CAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA<br>AAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCCTGCGCGTAATCTGCTG<br>CTTGCAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGGCCGATCA<br>AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT<br>ACCAAAATCTGTTCTTCTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCACTTCAAGAA<br>CTCTGTAGCACCCTTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACCACTGGC<br>TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTGGACTCAAGACGATA<br>GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA<br>GCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACGTAGATACCTACAGCGTGA<br>GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCC<br>GGTAAGCGGCAAGGTGCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG<br>AAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCCGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA<br>GGCTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGC<br>CAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCA<br>CATGTCTTTCTGCTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGC<br>CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGACGACCGAGCGCAGCGA<br>GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACGCTCTCCC<br>CGCGCTTGGCCGATTCAATTAATGACGTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG<br>GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT<br>GGCAGCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAAAT<br>TGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACGCTATGACCATGATTACGC<br>CAAGCTCTAGCTAGAGGTGAGTCCCTCCCAGCAGGCAGAGTATGCAAA<br>GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCA |

[0698]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|       |       | GGTTGTTGGTCCTCATATTACAGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG<br>TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC<br>TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT<br>ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT<br>GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br>TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG<br>CTATCCTAATAGAGATTAGGCTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG<br>TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT<br>CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT<br>AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA<br>TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG<br>GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT<br>CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA<br>ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTATAGGTTAA<br>TGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCAGCTTTTCGGGGAAA<br>TGTGCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA<br>TCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG<br>GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCG<br>GGCATTTTGCCTTCTGTTTTCGTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA<br>AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGCTGGATCT<br>CAACAGCGGTAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAAAT<br>GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGA<br>CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCCATACACTATTCTCAGAATGACTT<br>GGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT<br>AAGAGAAATATGCAAGTGCAGTGCATTAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA<br>CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGCA<br>CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGTATGTTGGGAACCGGAGCTGAA<br>TGAAAGCCATACCAACGACGACGCTGACACACGATGCCTGCAGCAATGGC<br>AACACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCG<br>GCAACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGCACTTCT<br>GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGG<br>TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGACGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC<br>CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA<br>ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATGGTA<br>ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCA<br>TTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGAC<br>CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA<br>AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCGCGCGTAATCTGCTG<br>CTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCA<br>AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT<br>ACCAAAATCTGTTCTTCTAGTGATAGCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA<br>CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGC<br>TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATA<br>GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACA<br>GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACGATACCTACAGCGTGA<br>GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCC<br>GGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG<br>AAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA<br>GCGTCGATTTTGTGATGCTCTGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGC<br>CAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCA<br>CATGTTCTTCTTCTGCTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACCGC<br>CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCGAAGCAGCGAGCGCAGCGA<br>GTCAGTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCC<br>CGCGGCTTGGCCGATTCAATATGCAAGTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG<br>GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA<br>GGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAAT<br>TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC<br>CAAGCTCTAGCTAGAGTCGAGTCCCTCCCGAGCGGAGAGTATGCAAA<br>GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCCCA |

[0699]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열<br>123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | TCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGAC<br>TAATTTTTTTTATTATGACAGAGCCGAGGCCGCTCGGCCCTGAGCTAT<br>TCCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTGCAAAAAGC<br>TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG<br>GACCTCTAGGCTCTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG<br>GGCAGAGCGCACATCGCCCAAGTCCCGGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCGG<br>CAATTGAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGA<br>TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT<br>AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG<br>AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGCCCTGGCCTCTTTACGGG<br>TTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT<br>TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTG<br>CGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCCTGGCCTGGGCG<br>CTGGGCGCGCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC<br>TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTGACCTGCTGCGACGCT<br>TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACATGG<br>TATTTCCGGTTTTTGGGCGCGGGCGCGCACGGGGCCCTGCGTCCAGCG<br>CACATGTTCCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG<br>GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCCTGGCCTCGCGCCG<br>GTGTATCGCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCGCTCGGACCAAGTTGC<br>GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATG<br>AGGACCGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCACACAAAGGAA<br>AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG<br>GGCGCCCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC<br>TTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG<br>GGTGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTCTGGA<br>ATTTCGCCCTTTTGTAGTTGGATCTTGGTTCAATTCAGGCTCAGACAGT<br>GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCCAGGTGTCGTGAGGAATTCCTAGAG<br>ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTGGG<br>CTGAGCTGGCTTTTCTTGTGCGGATTTTAAAGGTGTCAGTGC |
| V2    | 79    | ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTG<br>AAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGA<br>GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTC<br>CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br>TGCGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC<br>AGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGCAAGGCCGGAATCCCCGA<br>CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT<br>GGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT<br>TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCGCCCCGG<br>ACGAACATAAAGCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGAGTGC<br>ATGTAATCCCTTCAAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA<br>CATGTGACACGGGGGGGACCAAAACACAAAGGGTTCTCTGACTGTAGTTG<br>ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC<br>CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGAAGTCAACACACATTCGCTTTATGT<br>GTAACCTCTGGCTGAAGCTTTACACCAATGCTGGGGACATGTACCTCCC<br>AGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC<br>TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATAGCAATAGTGTGTT<br>ATAAGGCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT<br>AGTATATACTATCCAGACTAACCTTAATTCATAGCATATGTTACCCAACG<br>GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC<br>GATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTACATGGGGTCAGGA<br>TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTAGTCAAGGGCAGTGGCTGAAGATC<br>AAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTTCGCCCTGCTTCTCATTCCTC<br>TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT<br>GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGTGACGCCCCAGAAATAAAATTTGGA<br>CGGGGGGTTAGTGGTGGCATTTGTCTATGACACCAATAAACCTCACAA<br>ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCGAAATATCTT<br>TAACAAATAGAAATCCATGGGGTGGGACAAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA                                               |

[0700]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|       |       | TCTCACAGGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA<br>TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA<br>TGTGTTACACTCTATTTGTAAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC<br>AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAAATTAACCGGGCTCC<br>ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGA<br>TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCCTCGCGTTTGTG<br>ACTGTAAATAAGGGTGTAACTTGGCTGATTGTAAACCCGCTAACCCAC<br>TCGGCTCAAAACCACTTGCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC<br>CTGCATAAGTAGGTGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG<br>GAGGACAAATTACACACACTTGCGCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG<br>TCCTCATATTCACGAGTTCGCTGAGAGCAGGTGGGCTAATGTTGCCATGG<br>GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA<br>TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC<br>TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT<br>AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT<br>GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br>TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA<br>CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC<br>ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT<br>CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT<br>AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT<br>TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG<br>GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAACATGAGAATTTTCTTG<br>AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTCATGAT<br>AATAATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTCGCGG<br>AACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCAT<br>TAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATAT<br>GAGTATTCAACATTTCCGTCGCGCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTG<br>CCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGA<br>AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG<br>TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAGAAGCTTTCCAATGATGAGCAC<br>TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACCGCGGCA<br>AGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTTCTCAGAAAGACTTGGTTGAGTA<br>CTCACCAGTCACAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT<br>ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTTCGCGGCACTTACTTCT<br>GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGACAACATGGG<br>GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT<br>ACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCGTCAGCAATGGCAACAACGTT<br>GCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATT<br>AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC<br>CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG<br>GTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT<br>CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG<br>ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTACTGATTAAAGCATTGGTAACGTGTGAGA<br>CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACTTCATTTTAAATT<br>TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCC<br>TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA<br>AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAACTCTGCTGCTTGCAAAAC<br>AAAAAAACCCCGCTACAGCGGTGGTTTGTGTCGCGATCAAGAGCTACC<br>AACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATAC<br>TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGC<br>ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAG<br>TGCGGATAAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA<br>TAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTT<br>GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA<br>AAGCGCCACGCTTCCCAGGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG<br>CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCGCTG<br>GTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT<br>TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC |

[0701]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열<br>123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | GGCCCTTTTACGGTTCCCTGGCCCTTTTGCTGGCCCTTTTGCTCAGATGTTCTT<br>TCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTG<br>AGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGCAGCGAGCGAGCGAGTCAGTGAG<br>CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCTCTCCCGCGCGTTG<br>GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG<br>CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCAGTCATTAGGCACCCCA<br>GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTGTGTGGAATTGTGAGCGG<br>ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA<br>GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCGCAGCGCAGAGTATGCAAAGCATGCATC<br>TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAAGTCGCGCCATCCCGCCCC<br>TAAGTCGCGCCAGTCCCGCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT<br>TTATTTATGCAAGGCGGAGCGCGCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAAGT<br>AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAAG<br>ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGACGCTAATGGACCTTCTA<br>GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCGTCAGTGGGCAGAGCG<br>CACATCGCCCCAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC<br>CGGTGCCCTAGAGAAAGTTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA<br>CTGGCTCCGCCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAAT<br>AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTCGCGCCAGAACACAGGT<br>AAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGCTGGCTCTTTACGGGTTATGGCCCC<br>TTGCGTGCCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC<br>TCAGCTTCGGGTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTGAGGCTTGCCTTAAGG<br>AGCCCTTCGCTCGTGTGCTTGAAGTGGAGCTGGCTGGCGCTGGGGCCG<br>CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAA<br>GCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG<br>GCAAGATAGCTCTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGT<br>TTTTGGGGCGCGGGCGCGCAGCGGGCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTT<br>GGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCAGAAATCGGACGGGGTAGTC<br>TCAAGCTGGCGGGCTGCTCTGGTGCTGGCTCGCGCCGCGGTATCGC<br>CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACAGTTGCGTGAGCGGA<br>AAGATGGCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAAGGAGCTCAAATGGAGGACGCG<br>GGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACACACAAGGAAAGGGCTT<br>TCCGTCTCAGCGTCTGCTTATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTC<br>CAGGACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTTAGGTTG<br>GGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCGACACTGAGTGGGTGGAGAC<br>TGAAGTTAGGCGAGCTTGGCACTTGTATGTAATTCCTTTGGAATTGCGCT<br>TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG<br>TTTTTTCTTCCATTTCCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA<br>CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCTGCCCGCCC<br>AGCTGCTGGGCTGCTGCTGCTGCTTCCCGGCTCGCGATGC |
| V3    | 80    | CAACCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG<br>CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG<br>GGAGCCGTGACAGTGGCTTGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA<br>GTGGAGACCACACACCTTCCAAACAAAGCAACAAGTACCGCGGCCAGC<br>AGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGC<br>TGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA<br>GAATGTTTATGAGCGGCCCTCGAGGCGGCAAGGCGGATCCCCGACCT<br>CGACCTTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTTGGA<br>ATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTGG<br>TCGAGATCCCTCGGAGATCTTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCGGACG<br>AACTAAACCTGACTACGACATCTTGCCTTCTTCGCGGGCAGTGCAATG<br>TAATCCCTTCAAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACTGGGCGCTGTTCCACAT<br>GTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA<br>TCCTTATAAATGGATGTGACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG<br>GAGCAGACTTTGCACTGTGTGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA<br>ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCAGG<br>GGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCTGT<br>GTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA<br>AGGCCCTTGTTAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGCTAGTAGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[0702]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|       |       | ATATACTATCCAGACTAACCCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA<br>AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTTAAGGAACAGCGAT<br>ATCTCCCAACCCATGAGCTGTACGGTTTTATTACATGGGGTCAGGATTC<br>CACGAGGGTAGTGAAACATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG<br>GAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCCCTGCTTCTTCATTCTCTTC<br>GTTTAGCTAATAGAAATACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG<br>GTGCTCGAAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGAAATAAAATTGGACGG<br>GGGGTTCACTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCCTACAAACC<br>CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA<br>CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT<br>CACACGAATTTATGGCTATGGGCACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC<br>TGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGACGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT<br>GTTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC<br>GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCGAAAAATTAAACGGGGCTCCAGC<br>CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTGAAATTG<br>TGGAGTGGGGCAGCGCTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT<br>GTAAAATAAGGGTGTATAAATCTGGCTGATTGTAAACCCGCTAACCACTGC<br>GGTCAAACCACTTGCCCAACAAACCACTAATGGCACCCCGGGAATACCTG<br>CATAAGTAGGTGGGGGGCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG<br>GACAAATTACACACACTTGCGCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTGGTCC<br>TCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCAGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA<br>GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT<br>GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br>TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG<br>TATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG<br>TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG<br>AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA<br>CCAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA<br>TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG<br>GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT<br>TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC<br>TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT<br>AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAACATGAGAAATTTCTTGAAG<br>ACGAAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT<br>AATGGTTTCTTAGACGTACGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC<br>CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG<br>ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG<br>TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCCT<br>TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAAGA<br>TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAA<br>GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTT<br>TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGA<br>GCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC<br>ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATG<br>CAGTGTGTCATACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC<br>AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACACAACATGGGGGA<br>TCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC<br>AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG<br>CAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT<br>AGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT<br>TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC<br>TCGCGGTATCATGACGACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT<br>AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA<br>GATCGCTGAGATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCA<br>AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAA<br>AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA<br>ACGTGAGTTTTCGTTCCTAGCGCTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG<br>ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAA<br>AAAACCAACCGCTACACGCGGTGGTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAAC |

[0703]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | <p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p> TCTTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTAGT<br/> TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTGTAGCACC<br/> GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGG<br/> CGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA<br/> GGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGGA<br/> GCCAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG<br/> CGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG<br/> GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTA<br/> TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCTCGATTTTT<br/> GTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAACACGCCAGCAACGCGGC<br/> CTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTCTGGCCTTTTGTCTCAGATGTTCTTCC<br/> TGCCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGC<br/> TGATACCGCTCGCCGACGCCAAGACGACCGCAGCGCAGTCACTGAGCGA<br/> GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCCGCTCTCCCGCGGCTTGGCC<br/> GATTCAATTAATGACGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAG<br/> TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATAGGCCACCCAGGC<br/> TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTGAGCGGATA<br/> ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT<br/> AGAGGTCGAGTCCCTCCCGCAGGCGAGAAATGATGCAAGCATGCATCTCA<br/> ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAA<br/> CTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA<br/> TTTATGACAGAGGCGAGGCGCCTCGGCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGT<br/> GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAAGATG<br/> GATAAAGTTTAAACAGAGAGGAATCTTTCAGCTAATGGACCTTCTAGGT<br/> CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCGAGAGCGAC<br/> ATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGG<br/> TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTG<br/> GCTCCGCTTTTTTCCCGAGGTTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGACAGT<br/> CGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAG<br/> TGCGGTGTGTGGTTCCCGCGGCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCTTG<br/> CGTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATCTTGTATCCCGA<br/> GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCTTGGCTTAAGGAGC<br/> CCCTTCGCTCGTCTTGAATTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG<br/> CGTGCGAATCTGGTGGCAGCTTCGCGCTGCTCGCTGCTTCGATAAGTC<br/> TCTAGCCATTTAAATTTTGTGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA<br/> AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTT<br/> TGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGG<br/> GAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA<br/> AGCTGGCGGCTGCTCTGGTGCTGGCTCGCGCCGCGGTATCGCCCC<br/> GCCCTGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG<br/> ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCG<br/> CTCGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCCACACAAAGGAAAGGGCCTTCC<br/> GTCTCAGCCGTGCTTCACTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCCAG<br/> GCACCTCGATTAGTTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTAGGTTGGGG<br/> GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA<br/> AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTGCCCCTTT<br/> TGAGTTTGGATCTTGGTTCACTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAGATTT<br/> TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT<br/> CGAGATCCATTGTGCCCGGCGCCACCATGACTTGGACCCCACTCTCTTTC<br/> CTCACCTCTCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG </p> |
| V4    | 81    | <p>ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTG</p> <p> AAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAG<br/> GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC<br/> CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCACAGCCTCAGC<br/> AGCACCTTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br/> TGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAAC<br/> AGGGGAGAGTGTGAGCGGCGCTCGAGGCGGCAAGGCGGATCCCCGGA<br/> CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATGCAATAGTGTGTT<br/> GGAATTTTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATT </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[0704]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901<br>TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG<br>ACGAACATAAACCCTGACTACGACATCTCGCCCTTCTCGCGGGGCAGTGC<br>ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACCTGGGCCCTGTTCCA<br>CATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGTTCTCTGACTGTAGTTG<br>ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTTCATC<br>CTGGAGCAGACTTTGCACTCTGTGGACTGCAACACACATTGCCTTTATGT<br>GTAACCTTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC<br>AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACCAACGTCATCAGAGGGGCC<br>TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGT<br>ATAAGGCCCTTGTTAACCTTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT<br>AGTATATACTATCCAGACTAACCCCTAATTCATAGCATATGTACCCCAACG<br>GGAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGC<br>GATATCTCCACCCCATGAGCTGTACCGTTTATTACATGGGGTCAGGA<br>TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCAAGGGCAGTGGCTGAAGATC<br>AAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTCGCTGCTTCTTCATTCTCC<br>TTCTGTTAGCTAATAGAAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT<br>GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGATAAAATTTGGA<br>CGGGGGTTTCACTGGTGGCATTTGTGCTATGACACCAATATAACCTCACA<br>ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAACATCTGAATATCTT<br>TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCGCTAAAGACTGGATGTCCA<br>TCTCACAGAAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCTAGTGAATATGA<br>TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGACGGACCAAGACAGGTGAACCA<br>TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGTGGACGCCGACAGC<br>AGCGGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCGAAAAATTAACGGGGCTCC<br>ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAAGTGGCACTCTTTTTTTGAAA<br>TTGTGGAGTGGGGGCACGCTGAGCCCCACACGCCCTCGCGTTTGG<br>ACTGTAAATAAGGGTGAATAAATTGGCTGATTGTAAACCCGCTAACCCAC<br>TGCGGTCAAACCACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC<br>CTGCAATAAGTAGGTGGCGGGCCCAAGTAGGGCGCGATTGCTGCGATCTG<br>AGGACAAATTACACACACTTGCGCTGAGCGCCAAAGCACAGGGTTGTGG<br>TCTCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGTAAATGTGCCATGG<br>GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTTAATCTATA<br>TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC<br>TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT<br>AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT<br>GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br>TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA<br>CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC<br>ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT<br>CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT<br>AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATA<br>TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG<br>GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAAACATGAGAATTTTCTTG<br>AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTCATGAT<br>AATAATGGTTTCTTAGACGTACGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG<br>AACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCAT<br>GAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT<br>GAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTG<br>CCTTCTGTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGA<br>AGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG<br>TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGGAAGACGTTTTCATGATGAGCAC<br>TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCA<br>AGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTGGTTGAGTA<br>CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGATGGCATGACAGTAAGAGAATT<br>ATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT<br>GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAACATGGG<br>GGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCAT<br>ACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCAAGCAATGGCAACAACGTT<br>GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCACAAAT |

[0705]

| 배터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열<br>123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTCTGCGCTCGGC<br>CCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG<br>GTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT<br>CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG<br>ACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCCTGATTAGCATTTGGTAACCTGTGAGA<br>CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATT<br>TAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC<br>TTAAGCTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGCTAGACCCCGTAGAAAAAGATCAA<br>AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAAC<br>AAAAAAACCAACCGCTACAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACC<br>AACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACAGAGCGCAGATACCAAAATAC<br>TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC<br>ACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG<br>TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA<br>TAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTT<br>GAGCGCAACGACCTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA<br>AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTTAAGCGG<br>CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCGCTG<br>GTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATT<br>TTTGATGCTGCTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC<br>GGCCTTTTACGGTTCTGCGCTTTTGCTGCGCTTTTGCTCAGATGTTCTT<br>TCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTG<br>AGCTGATACCGCTCGCCGACCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG<br>CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTG<br>GCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCGACTGGAAGCGGG<br>CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGTCTACATAGGCAACCCCA<br>GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGPGGAATTGTGAGCGG<br>ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA<br>GCTAGAGTGCAGTCCCTCCCGCAGGAGCAAGATGCAAGCATGCAATC<br>TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCT<br>TAACTCCGCCAGTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTT<br>TTATTTATGCAAGGCGAGGCGCGCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAAGT<br>AGTGAGGAGGCTTTTTTGAGGCTTAGGCTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAAG<br>ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAAGTAAAGGACCTTCTA<br>GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCTCAGTGGGAGAGCG<br>CACATCGCCACAGTCCCGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC<br>CGGTGCCAGAGAAAGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTATGTCGTGTA<br>CTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGTTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGAGT<br>AGTCGCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGT<br>AAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGCTGGCTCTTTACGGTTATGGCCC<br>TTGCTGCGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC<br>CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCTTGCCTTAAGG<br>AGCCCTTCGCTCGTGTGTTGAGTTGAGGCTGGCTGGGCGCTGGGGCGG<br>CCGCGTGCAGATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGTGTCTTCGATAA<br>GTCTTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTG<br>GCAAGATAGTCTTGAAATGCGGGCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT<br>TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGCTCCAGCGCAGATGTT<br>GGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAAATCGACGGGGGTAGTC<br>TCAAGCTGGCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCTCGCGCCGCGGTATCGC<br>CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGA<br>AAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG<br>CGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCAACAAAGGAAAGGGCCTT<br>TCCGTCTCAGCGTGCCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGCGCCGCTC<br>CAGGCACCTCGATTAGTCTCGAGCTTTTGAGTACGTGCTCTTTAGGTTG<br>GGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCGCACCTGAGTGGGTGGAGAC<br>TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGGAATTTGCCCT<br>TTTTGAGTTGGATCTTGGTTCATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG<br>TTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTGTCGAGGAATTTCTAGAGATCCCTCGA<br>CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCACTCTCTCT |

[0706]

| 벡터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| V5    | 82    | TCCTCACCTCCTCCTCCTCACTGCACAGGAAGCTTATCG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|       |       | CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCTCCGCTCCTCTGAGGAG<br>CTTCAAGCCAACAAGGCCACTGTGTGTCTCATAGTGACTTCTACCCG<br>GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA<br>GTGGAGACCAACACCTCCAAACAAAGCAACAAGTACGCGGCCAGC<br>AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCAAGAGCTACAGC<br>TGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA<br>GAATGTTTATGAGCGGCCCTCGAGGCCGCAAGGCCGATCCCCGACCT<br>CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTGGA<br>ATTTTTGTGTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTGG<br>TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCGGACG<br>AAGCTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCCTCTTCGCGGGGCAAGTGCATG<br>TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGCCCTGTTCACAT<br>GTGACACGGGGGGGACCAAAACAAAGGGGTCTCTGACTGTAGTTGACA<br>TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACCTGAGTGGCTTTTCATCTCTG<br>GAGCAGACTTTGCACTGTGTGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA<br>ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGACATGTACCTCCAGG<br>GGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCATCAGAGGGGCTGT<br>GTAGTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA<br>AGGCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT<br>ATATACTATCCAGACTAACCTTAATTCATAGCATATGTACCCAACGGGA<br>AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAGGGTCTAAGGAACAGCGAT<br>ATCTCCCAACCCATGAGCTGTACGGTTTATTTTACATGGGGTCAGGATTC<br>CACGAGGTAGTGAACCATTTAGTCAACAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG<br>GAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCTGCTTCTTCATCTCTCTC<br>GTTTACCTAATAGAAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG<br>GTGCTCGAAACAAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGAAATAAATTTGGACGG<br>GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCTCACAACCC<br>CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAACATTTCTGAATATCTTTAA<br>CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGCAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT<br>CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC<br>TGGGTTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT<br>TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC<br>GGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCGGAAATTAACGGGGCTCCACG<br>CCAATGGGGCCATAAACAAGACAAAGTGGCCACTCTTTTTTTGAAATTG<br>TGGAGTGGGGGACCGCTCAGCCCCACACGCCGCTTGGGCTTTTGGACT<br>GTAAATAAGGGTGAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC<br>GGTCAAAACCACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG<br>CATAAGTAGGTGGGCGGGCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG<br>GACAAATTACACACACTTGCCTGAGCGCCAGCACAGGGTTGTGGTCC<br>TCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA<br>GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT<br>GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br>TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG<br>CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG<br>TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG<br>AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA<br>CCCAAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA<br>TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG<br>GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT<br>TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC<br>TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT<br>AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAACATGAGAATTTTCTTGAAG<br>ACGAAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT<br>AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC<br>CCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCATGAG<br>ACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAG<br>TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCAATTTGCT<br>TCCTGTTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGA |

[0707]

| 배터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열<br>123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA<br>GATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTT<br>TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA<br>GCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC<br>ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG<br>CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC<br>AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAATGGGGGA<br>TCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC<br>AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG<br>CAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT<br>AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCT<br>TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC<br>TCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT<br>AGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA<br>GATCGCTGAGATAGGTGCTTACTGATTAAAGCATGGTAACCTGTCAGACCA<br>AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCAATTTTTAATTTAA<br>AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA<br>ACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG<br>ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAA<br>AAAACCAACCGCTACCAAGCGGTGGTTGGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAAC<br>TCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTACTGT<br>TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC<br>GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGG<br>CGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA<br>GCGCGAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGGA<br>GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAG<br>CCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG<br>GGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTA<br>TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT<br>GTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGC<br>CTTTTTACGGTTCTCGGCCCTTTTGTGCGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCC<br>TCGCTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGC<br>TGATACCGCTCGCCGACGCCAAGACGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGGA<br>GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCC<br>GATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG<br>TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGC<br>TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGAATTGTGAGCGGATA<br>ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT<br>AGAGGTCGAGTCCCTCCCGACGAGCAGAAATGCAAAAGCATGCATCTCA<br>ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAA<br>CTCCGCCAGTTCCGCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA<br>TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT<br>GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAAGATG<br>GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT<br>CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC<br>ATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG<br>TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAACTGGGAAGTGATGTCGTGTAAGT<br>GCTCCGCCTTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAAGTAGT<br>CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG<br>TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGCCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTG<br>CGTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATCTTTGATCCCGA<br>GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCTTGCCTTAAGGAGC<br>CCCTTCGCCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCTTGCCCTGGGCGCTGGGGCCCGC<br>CGTGCAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTTTCGATAAGTCT<br>TAGGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA<br>AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTT<br>TGGGGCCCGGGGCGGCGAGCGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGC<br>GAGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCA<br>AGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCC |

[0708]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|       |       | GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG<br>ATGGCCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG<br>CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAGGGCCTTTCC<br>GTCTTCAGCCGTCGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAG<br>GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGTTGGGG<br>GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA<br>AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTGCCCTTTT<br>TGAGTTTGGATCTTGGTTCACTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT<br>TTTTCTTCCATTTCAAGTGTCTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT<br>CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCAG<br>CTGCTGGGCTGCTGCTGTGTTTCCCGGCTCGCGATGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| V7    | 83    | GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC<br>ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC<br>GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGCTGCAC<br>ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTG<br>GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG<br>AATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCT<br>TGTGACAAAACACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGG<br>GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATC<br>TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC<br>CCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC<br>AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAG<br>GTCTCACCGTCTGCACACGAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC<br>AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br>GCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGC<br>GAGGAGATGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTC<br>TATCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAAC<br>AACTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTC<br>TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC<br>TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGC<br>CTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGCGGCCGCTCGAGGCGCGCAAGGCCGG<br>ATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA<br>TAGTGTGTGGAAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG<br>CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC<br>CCGCCCGGAGCAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCG<br>GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTGGTACAACCTGCCTAACTGGGC<br>CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTTCTCTGA<br>CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG<br>GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGAGTCTGTGGACTGCAACACAACTTG<br>CCTTTATGTGTAACCTTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT<br>GTACCTCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC<br>AGAGGGGCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCA<br>ATAGTGTTTATAAGGCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTC<br>CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCTTAATTCAAATGACATATGT<br>TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTTA<br>AGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTACGGTTTTATTATCATG<br>GGGTCAGGATTCACAGGGGTAGTGAACATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG<br>CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCTGCTTCT<br>TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA<br>GGTGTATGTAGGTGCTCGAAACAAGGTTTCAAGTGACGCCCCAGAAATA<br>AAATTTGACGCGGGGTTCAAGTGGTGGCATTTGTCTATGACACCAATATAA<br>CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCT<br>GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT<br>GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCACACATAATCTTAGT<br>GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACA<br>GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC<br>GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCGAAAATTAATA<br>CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT<br>TTTTGAATTTGTGAGTGGGGCACGCTCAGCCCCACACGCGCCCTG |

[0709]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | <p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>CGGTTTTGGACTGTAAATAAGGGTGTAACTTGGCTGATTGTAACCCC<br/> GCTAACCCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCAAAAACCACCTAATGGCACCCC<br/> GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGCGGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC<br/> TGCATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCCTTGAGCGCCAAGCACAG<br/> GGTGTGGTCTCATATTCAGGAGTCTGTAGAGCACGGTGGGCTAATG<br/> TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATACTGGATAGCATATGCTATCC<br/> TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT<br/> ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT<br/> GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA<br/> TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG<br/> CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG<br/> TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT<br/> CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT<br/> AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA<br/> TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG<br/> GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT<br/> CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA<br/> ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCCTATTTTATAGGTTAA<br/> TGTCATGATAAATAATGGTTTCTTAGACGCTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA<br/> TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA<br/> TCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG<br/> GAAGATATGAGTATTCACATTTCGGTGTGCCCTTATTCCTTTTTCG<br/> GGCATTTTGCCTTCTGTTTTGTCTACCCAGAACCGCTGGTGAAAGTAA<br/> AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT<br/> CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCTAAT<br/> GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTAATCCCGTGTGA<br/> CGCCGGGCAAGACAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT<br/> GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT<br/> AAGAGAAATTATGACAGTCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGGCAA<br/> CTTACTTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGCA<br/> CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA<br/> TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCGTCAGCAATGGC<br/> AACACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG<br/> GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT<br/> GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG<br/> TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC<br/> CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA<br/> ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGATTGGTA<br/> ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTCA<br/> TTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGAC<br/> CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGA<br/> AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG<br/> CTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCGAGCGTGGTTTGTGTTGCGCGATCA<br/> AGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT<br/> ACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA<br/> CTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC<br/> TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATA<br/> GTTACCGGATAAAGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACA<br/> GCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA<br/> GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCC<br/> GGTAAGCGGCAGGGTCTGGAACAGGAGAGCGCACAGGGAGCTTCCAGGGGG<br/> AAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA<br/> GCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCTATGGAAAAACGC<br/> CAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTTGGGCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCA<br/> CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACCGC<br/> CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA<br/> GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCTCTCC<br/> CGCGCTTGGCCGATTCAATTAATGACGCTGGCACGACAGGTTTCCGACTG<br/> GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCAGTCATTA</p> |

[0710]

| 백터 명칭 | 서열 번호 | 뉴클레오타이드 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       | 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|       |       | GGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT<br>TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC<br>CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCGCAGGAGCAAGTATGCAAA<br>GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAATCCGCCCA<br>TCCCGCCCCTAATCCGCCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGAC<br>TAATTTTTTTTATTATGACAGAGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAGCTAT<br>TCCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGC<br>TTTGCAAGATGGATAAAGTTTAAACAGAGAGGAATCTTGCAGCTAATG<br>GACCTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCTGTCAGTG<br>GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAAGTTGGGGGAGGGTTCGG<br>CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGA<br>TGTCGTGTAAGGCTCCGCCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT<br>AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG<br>AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGCCCTGGGCTCTTTACGGG<br>TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT<br>TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTG<br>CGTTAAGGAGCCCTTCGCCCTCGTGTGAGTTGAGGCTGGCTGGGCG<br>CTGGGCGCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGC<br>TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCT<br>TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG<br>TATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCACGGGGCCCGTGGTCCAGCG<br>CACATGTCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG<br>GGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGGCTGCTCTGGTGCCTGGGCTCGCGCCGCC<br>GTGATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTGGCAGCAGTTGC<br>GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATG<br>GAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA<br>AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGAGTACCG<br>GGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTACGTGCTC<br>TTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG<br>GGTGAGACTGAAGTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGA<br>ATTTGCCCTTTTGTAGTTGGATCTTGGTTCATTCAGCCTCAGACAGT<br>GGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTCAGGTGTCGTGAGGAATCTCTAGAG<br>ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTGGG<br>CTGAGCTGGCTTTTCTGTGCGGATTTAAAGGTGTCCAGTGC |

[0711]

[0712]

본 발명은 분자생물학 및 약물 전달 분야에서 널리 공지된 전반적인 기술에 대한 참조문헌을 인용한다. 이들 기술은 하기의 공개문헌에 기재된 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

- Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993);
- Ausubel et al. (eds.), Short Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (4<sup>th</sup> edition, 1999) (ISBN 0-471-32938-X)
- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
- Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
- Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981;
- Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
- Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
- Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;
- Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5);
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
- Langer and Wise (eds.), Medical Applications of Controlled Release, CRC Press, Boca Raton, FL (1974);
- Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X);
- Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4);
- Robinson, J.R. (ed.), Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., NY (1978);
- Ruan, Q., Skinner, J.P. and Tetin, S.Y. Using non-fluorescent FRET acceptors in protein binding studies. Analyt. Biochemistry (2009), 393, 196-204;
- Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6);
- Smolen and Ball (eds.), Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, John Wiley & Sons, NY (1984);

[0713]

Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufits), 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

## 참조문헌 인용

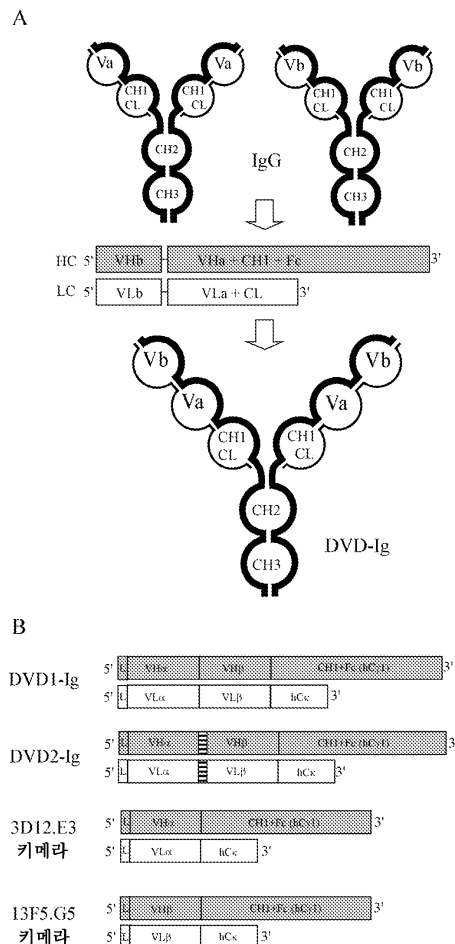
모든 인용된 문헌(특정 분야의 문헌, 특허, 특허원, 데이터베이스 및 웹사이트를 포함)의 내용이 본원에 참조로서 인용될 수 있고 이에 의해 본원에 인용된 참조문헌으로서 임의의 목적에 대한 이들의 전문이 특별하게 인용된다. 본 발명의 수행은 달리 언급되지 않는 경우 당업계에 널리 공지된 바와 같은 면역학, 분자 생물학 및 세포 생물학을 사용한다.

## 균등 범위

본 발명은 취지 또는 필수 특성을 벗어나지 않고 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 따라서 이전의 양태는 모든 측면에서 본원에 기재된 발명을 제한하기 보다는 설명하기 위해 제공된 것으로 간주되어야 한다. 발명의 범위는 따라서 이전에 기재된 것 보다는 첨부된 특허청구범위에 지적되어 있고 따라서 특허청구범위의 균등한 의미 및 범위내에서의 모든 변화는 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

## 도면

### 도면1



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> DUAL VARIABLE DOMAIN IMMUNOGLOBULINS AND USES THEREOF

<130> 10116.US.01

<150> 61/229,586

<151> 2009-07-29

<150> 61/252,790

<151> 2009-10-19

<160> 83

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 1

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 2

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

Val

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 3

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 4

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 5

Ser Ala Lys Thr Thr Pro

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 8

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 9

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400>

> 10

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala

1 5 10 15

Arg Val

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 12

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 13

Thr Val Ala Ala Pro

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 14

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 15

Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 16

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

peptide

<400> 17

Ala Lys Thr Thr Pro Pro

1 5

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 18

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 19

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1 5

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 20

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 22

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 24

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 25

Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 26

Gly His Glu Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser  
1 5 10 15

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 27

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala  
1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
20

<210> 28

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Thr

1                    5                    10                    15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

20                    25

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20                    25                    30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35                    40                    45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50                    55                    60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85                    90                    95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110  
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
115 120  
<210> 31  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide  
<400> 31  
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Pro Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
20 25 30  
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45  
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
65 70 75 80  
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105  
<210> 32  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide  
<400> 32  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly  
20 25 30  
Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60  
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe  
65 70 75 80  
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115  
<210> 33  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide  
<400> 33  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu

85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 36

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 37

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 38

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 38

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Leu | Arg | Leu |
| Ser | Cys | Thr | Ala |
| Ser | Gly | Phe | Thr |
| Phe | Ser | Ser | Tyr |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Ala | Met | Asn | Trp |
| Val | Arg | Gln | Ala |
| Pro | Gly | Lys | Gly |
| Leu | Glu | Trp | Val |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Ser | Ala | Ile | Ser |
| Gly | Ser | Gly | Gly |
| Thr | Thr | Phe | Tyr |
| Ala | Asp | Ser | Val |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe |
| Thr | Ile | Ser | Arg |
| Asp | Asn | Ser | Arg |
| Thr | Thr | Leu | Tyr |

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Gln | Met | Asn |
| Ser | Leu | Arg | Ala |
| Glu | Asp | Thr | Ala |
| Val | Tyr | Tyr | Cys |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Lys | Asp | Leu |
| Gly | Trp | Ser | Asp |
| Ser | Tyr | Tyr | Tyr |
| Tyr | Tyr | Tyr | Gly |
| Met |     |     |     |
| 100 | 105 | 110 |     |
| Asp | Val | Trp | Gly |
| Gln | Gly | Thr | Thr |
| Val | Thr | Val | Ser |
| Ser |     |     |     |
| 115 | 120 | 125 |     |

<210> 39

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 39

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Phe | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   | 5   | 10  | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Gly | Ile | Arg | Asn | Asp |
| 20  | 25  | 30  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Gly | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Arg | Leu | Ile |
| 35  | 40  | 45  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu His Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Cys

85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 40

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 41

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 42

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45  
Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80  
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn  
20 25 30  
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile  
35 40 45  
Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 44

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400>

> 44

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 45

<211> 111

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 45

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn  
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 46

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 47

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225                      230                      235                      240  
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                         245                      250                      255  
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                         260                      265                      270  
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
                         275                      280                      285  
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

                         290                      295                      300  
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305                      310                      315                      320  
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

                         325                      330

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
1                      5                      10                      15  
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

                         20                      25                      30  
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
                         35                      40                      45  
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
                         50                      55                      60  
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65                      70                      75                      80  
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

                         85                      90                      95  
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                         100                      105

<210> 49

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 35 40 45  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 50 55 60  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 65 70 75 80  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 85 90 95  
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 50

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125  
Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu  
130 135 140  
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
145 150 155 160  
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly  
165 170 175

Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr  
180 185 190  
Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
195 200 205  
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
210 215 220  
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp  
225 230 235 240

Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
245 250 255

<210> 51

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 51

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu

115 120 125

Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Pro Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr

130 135 140

Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln

145 150 155 160

Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn

165 170 175

Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

180 185 190

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr

195 200 205

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly

210 215 220

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

225 230

<210> 52

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 52

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

180 185 190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

195 200 205  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 210 215 220  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr

225 230 235 240  
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250 255

<210> 53

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 53

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Pro Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30  
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser  
 115 120 125  
 Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser  
 130 135 140

Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro

145 150 155 160

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser

165 170 175

Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe

180 185 190

Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

195 200 205

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr

210 215 220

Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230

<210> 54

<211> 258

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
 130 135 140  
 Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 145 150 155 160

Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
 165 170 175  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr  
 180 185 190  
 Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu  
 195 200 205  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp  
 210 215 220

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg  
 225 230 235 240  
 Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val  
 245 250 255  
 Ser Ser

<210> 55

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 55

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30  
Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95  
Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110  
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Asp Ile Leu Leu  
115 120 125  
Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr  
130 135 140

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr  
145 150 155 160  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
165 170 175  
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
180 185 190  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys  
195 200 205

Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp  
210 215 220  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
225 230 235

<210> 56

<211> 258

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

145 150 155 160

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln

165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly

180 185 190

Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser

195 200 205

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly

225                      230                      235                      240  
 Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
                          245                      250                      255  
 Ser Ser

<210> 57

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 57

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
                          20                      25                      30  
 Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro  
                          35                      40                      45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro  
                          50                      55                      60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr  
                          85                      90                      95  
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
                          100                      105                      110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu  
                          115                      120                      125

Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile  
                          130                      135                      140  
 Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp  
 145                      150                      155                      160

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp  
165 170 175

Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser  
180 185 190

Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu  
195 200 205

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val  
210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
225 230 235

<210> 58

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125  
Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly

130 135 140  
Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly

145 150 155 160  
Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly

165 170 175  
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp

180 185 190  
Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser

195 200 205  
Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr

210 215 220  
Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe

225 230 235 240  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

245 250

<210> 59

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 59

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105 110  
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Asp Ile Leu Leu

115 120 125  
 Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser  
 130 135 140  
 Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser  
 165 170 175  
 Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

180 185 190  
 Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala  
 195 200 205  
 Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala  
 210 215 220  
 Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

225 230  
 <210> 60  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 60  
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
130 135 140

Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
145 150 155 160

Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
165 170 175

Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr  
180 185 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
195 200 205

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe  
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 61

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 61

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala

115 120 125

Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly

130 135 140

Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu

145 150 155 160

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro

165 170 175

Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala

180 185 190

Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr

195 200 205

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly

210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230

<210> 62

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly

130 135 140

Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

145 150 155 160

Gly Ser Val Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser

165 170 175  
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn

180 185 190  
Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp

195 200 205  
Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala

210 215 220  
Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe

225 230 235 240  
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

245 250  
<210> 63  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 63  
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn  
20 25 30  
Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45  
Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95  
Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110  
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met  
115 120 125  
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
130 135 140  
Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr  
145 150 155 160  
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser

165 170 175  
Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
180 185 190  
Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala  
195 200 205  
Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu Ala Phe Gly Gly  
210 215 220  
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
225 230

<210> 64

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 64

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly  
20 25 30  
Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe  
65 70 75 80  
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125  
Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
130 135 140  
Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
145 150 155 160  
Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
165 170 175

Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr  
180 185 190  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
195 200 205  
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
210 215 220  
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe  
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 65

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                     20                      25                      30  
  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                     35                      40                      45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                     50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu  
                     85                      90                      95  
  
 Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                     100                      105                      110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala  
                     115                      120                      125  
 Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly  
                     130                      135                      140  
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu  
 145                      150                      155                      160  
  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro  
                     165                      170                      175  
 Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala  
                     180                      185                      190  
 Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
                     195                      200                      205  
 Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly  
                     210                      215                      220  
  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225                      230  
 <210> 66  
 <211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

145 150 155 160

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr

180 185 190

Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr

195 200 205

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

210 215 220  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala

225 230 235 240  
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 67

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 67

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met

115 120 125

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

130 135 140

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr

145                      150                      155                      160  
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser  
                          165                      170                      175  
 Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly  
                          180                      185                      190  
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
                          195                      200                      205  
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln

210                      215                      220  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 225                      230  
 <210> 68  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 68  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
                          20                      25                      30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                          35                      40                      45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
                          50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                          85                      90                      95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                          100                      105                      110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 130 135 140  
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 145 150 155 160

Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 165 170 175  
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr  
 180 185 190  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 195 200 205  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 69

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50                      55                      60  
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
                     85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                     100                      105                      110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala  
                     115                      120                      125  
 Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly  
                     130                      135                      140  
  
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro  
                     165                      170                      175  
 Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala  
                     180                      185                      190  
 Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
                     195                      200                      205  
  
 Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly  
                     210                      215                      220  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225                      230  
 <210> 70  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                     polypeptide  
 <400> 70  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly

145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr

180 185 190

Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

195 200 205

Ser Arg Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Leu Gly Trp Ser Asp Ser Tyr

225 230 235 240

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

245 250 255

Val Ser Ser

<210> 71

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 71

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met

115 120 125

Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

130 135 140

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly Trp Tyr

145 150 155 160

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser

165 170 175

Arg Leu His Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

180 185 190

Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Cys Ser Phe Gly Gln  
210 215 220

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
225 230

<210> 72

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 72

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu

130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg  
 165 170 175  
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp  
 180 185 190  
 Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile

195 200 205  
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 210 215 220  
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 245 250 255  
 Val Ser Ser

<210> 73

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp  
 20 25 30  
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu His Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Cys  
85 90 95  
Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala  
115 120 125  
Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly  
130 135 140  
Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu  
145 150 155 160  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro  
165 170 175

Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala  
180 185 190  
Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
195 200 205  
Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly  
210 215 220  
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
225 230

<210> 74

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly  
 130 135 140  
 Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Ile Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro  
 165 170 175  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr  
  
 180 185 190  
 Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr  
 195 200 205  
 Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp  
 210 215 220  
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp  
 225 230 235 240  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 75

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 75

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met

115 120 125

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

130 135 140

Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu

145 150 155 160

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr

165 170 175

Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

180 185 190

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly

210 215 220  
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 225 230  
 <210> 76  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 76  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
 20 25 30  
 Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 165 170 175

Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser

180 185 190  
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu  
195 200 205  
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
210 215 220  
Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
225 230 235 240  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 77

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 77

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn  
20 25 30  
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile  
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala  
 115 120 125  
 Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly  
 130 135 140  
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro  
 165 170 175

Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala  
 180 185 190  
 Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 195 200 205  
 Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230

<210> 78

<211> 7185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polynucleotide

<400> 78

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg  | 60  |
| ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg  | 120 |
| tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca  | 180 |
| ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc   | 240 |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc  | 300 |
| aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga   | 360 |
| ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcattgatctc ccggaccctt | 420 |
| gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg  | 480 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac  | 540 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| agcacgtacc gtgtggtcag cgtcttcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag  | 600  |
| gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc  | 660  |
| aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgcgaggag  | 720  |
| atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc | 780  |
| gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg  | 840  |
| ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg  | 900  |
| cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg  | 960  |
| cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagcgcccg ctcgaggccg gcaaggccgg  | 1020 |
| atcccccgac ctcgacctct ggctaataaa ggaattttat tttcattgca atagtgtgtt  | 1080 |
| ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttggctcgaga | 1140 |
| tccctcggag atctctagct agaggatcga tccccgcccc ggacgaacta aacctgacta  | 1200 |
| cgacatctct gccccttctt cgcggggcag tgcattgaat ccttcagtt ggttggta     | 1260 |
| acttgccaac tgggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaaggggtt  | 1320 |
| ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca tttgccaaca ctgagtggct  | 1380 |
| ttcatcttgg agcagacttt gcagctctgt gactgcaaca caacattgcc tttatgtgta  | 1440 |
| actcttggct gaagctctta caccaatgct gggggacatg tacctcccag gggcccagga  | 1500 |
| agactacggg aggtctacac aacgtcaatc agaggggcct gtgtagctac cgataagcgg  | 1560 |
| acctcaaga gggcattagc aatagtgttt ataaggcccc cttgttaacc ctaaaccgggt  | 1620 |
| agcatatgct tcccgggtag tagtatatac tatccagact aacctaatc caatagcata   | 1680 |
| tgttacccaa cgggaagcat atgctatcga attaggttta gtaaaagggt cctaaggaac  | 1740 |
| agcgatatct cccacccat gagctgtcac ggtttttatt acatggggtc aggattccac   | 1800 |
| gagggtagtg aaccatttta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcgggcagtg  | 1860 |
| aactctcttg aatcttcgcc tgcttcttca ttctcttcg tttagctaata agaataactg  | 1920 |
| ctgagttgtg aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaac acaaggtttc aggtgacgcc  | 1980 |
| cccagaataa aatttggacg gggggttcag tgggtggcatt gtgctatgac accaatataa | 2040 |
| ccctcacaaa ccccttgggc aataaatact agttagtgaa tgaaacattc tgaatatctt  | 2100 |
| taacaataga aatccatggg gtggggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg  | 2160 |
| aatttatggc tatgggcaac acataatcct agtgcaatat gatactgggg ttattaagat  | 2220 |
| gtgtcccagg cagggaccaa gacaggtgaa ccatgttgtt acactctatt tgtaacaagg  | 2280 |
| ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactggt tgtctctaac acccccgaac  | 2340 |
| attaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actctttttt   | 2400 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ttgaaattgt ggagtggggg cacgcgtcag cccccacag cgcacctgcg gttttggact    | 2460 |
|                                                                     |      |
| gtaaaataag ggtgtaataa cttggtgat tgaaccccg ctaaccactg cggtaaacc      | 2520 |
| acttgcacac aaaaccacta atggcaccac ggggaatacc tgcataagta ggtgggcggg   | 2580 |
| ccaagatagg ggcgcgattg ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag   | 2640 |
| cgccaagcac agggttgttg gtcctcatat tcacgagtc gctgagagca cggtaggcta    | 2700 |
| atgttgccat gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaactct  | 2760 |
| atatctgggt agcataggct atcctaactct atatctgggt agcatatgct atcctaactct | 2820 |
| atatctgggt agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaactct  | 2880 |
|                                                                     |      |
| atatctgggt agcatatgct atcctaactct atatctgggt agtatatgct atcctaactct | 2940 |
| glatccgggt agcatatgct atcctaatag agattagggt agtatatgct atcctaattt   | 3000 |
| atatctgggt agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat   | 3060 |
| ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat   | 3120 |
| ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat   | 3180 |
| ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat   | 3240 |
| ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat cgggtagca tatgctatcc tcatgataag    | 3300 |
|                                                                     |      |
| ctgtcaaaca tgagaatttt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata   | 3360 |
| ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcagggt ggcaactttc ggggaaatgt  | 3420 |
| gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacatcca aatatgtatc cgctcatgag   | 3480 |
| acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca   | 3540 |
| tttccgtgtc gcccttatcc ctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc    | 3600 |
| agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat   | 3660 |
| cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc   | 3720 |
|                                                                     |      |
| aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtg ttatcccgtg ttgacgccgg   | 3780 |
| gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc   | 3840 |
| agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat    | 3900 |
| aacctgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga     | 3960 |
| gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc   | 4020 |
| ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc   | 4080 |
| aacaacgttg cgaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt    | 4140 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| aatagactgg atggaggcgg ataaagtgtc aggaccactt ctgcgctcgg cctttccggc | 4200 |
| tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggtctcgcg gtatcattgc  | 4260 |
| agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca | 4320 |
| ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca  | 4380 |
| ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt | 4440 |
| ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta | 4500 |
| acgtgagttt tcgttcact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg  | 4560 |
|                                                                   |      |
| agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg ctgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc  | 4620 |
| ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag  | 4680 |
| cagagcgtag ataccaaata ctgttcttct agttagccg tagttaggcc accacttcaa  | 4740 |
| gaactctgta gcaccgccta catactcgc tctgctaate ctgttaccag ttgctgctgc  | 4800 |
| cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc | 4860 |
| gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta | 4920 |
| caccgaactg agatactac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag  | 4980 |
|                                                                   |      |
| aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct  | 5040 |
| tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga  | 5100 |
| gcgtcgattt ttgtgatgtc cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc | 5160 |
| ggccttttta cggttcctgg ccttttgcgt gccttttgc cacaatgtt ttcctgcgtt   | 5220 |
| atccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg  | 5280 |
| cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg | 5340 |
| caaaccgct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc  | 5400 |
|                                                                   |      |
| cgactggaaa ggggagctg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc  | 5460 |
| acccaggtt ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata  | 5520 |
| acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga | 5580 |
| gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag | 5640 |
| tcccgcctt aactccgcc atccgcctt taactccgc cagttccgc cattctccgc      | 5700 |
| cccatggctg actaattttt ttattttatg cagaggccga ggccgctcg gcctctgagc  | 5760 |
| tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctttgca | 5820 |
|                                                                   |      |
| aagatggata aagtttttaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tctaggtctt | 5880 |
| gaaaggagtg ggaattggct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cgcacacagt  | 5940 |
| ccccgagaag ttggggggag gggctcgcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgagg | 6000 |

ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg gtgggggaga 6060  
accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag 6120  
aacacaggta agtgccgtgt gtgggtcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc 6180  
ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg 6240

ggttggaagt ggggtgggaga gttcgaggcc ttgcgcttaa ggagcccctt cgcctcgtgc 6300  
ttgagttgag gcctggcctg ggcgtgggg ccgccgcgtg cgaatctggt ggcaccttcg 6360  
cgcctgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgctgc 6420  
gacgtttttt ttctggcaag atagtctgt aatgcgggc caagatctgc aactggtat 6480  
ttcggttttt ggggcccgcg gcggcgacgg gggccgtgcg tcccagcgca catgttcggc 6540  
gaggcggggc ctgcgagcgc ggcaccgag aatcgacgg gggtagtctc aagctggccg 6600  
gcctgctctg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgccctggg cggcaaggct 6660

ggccccgtcg gcaccagttg cgtgagcggg aagatggccg cttcccggcc ctgctgcagg 6720  
gagctcaaaa tggaggacgc ggcgtcggg agagcgggcg ggtgagtcac ccacacaaag 6780  
gaaaagggcc tttccgtcct cagccgtcgc ttcatgtgac tccacggagt accgggcgcc 6840  
gtccaggcac ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtcttttag gttgggggga 6900  
ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc 6960  
ttggcacttg atgtaattct ctttggatt tgcccttttt gagtttgat cttggttcat 7020  
tctcaagcct cagacagttg ttcaaagttt tttcttcca tttcaggtgt cgtgaggaat 7080

tctctagaga tcctcgacc tcgagatcca ttgtgcccg gcgccacat ggagtttggg 7140  
ctgagctggc tttttcttgt cgcatttta aaagtggtcc agtgc 7185

<210> 79

<211> 6521

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 79

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60  
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatcca gagaggccaa agtacagtgg 120  
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180  
  
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300

ttcaacaggg gagagtgttg agcgcccgct cgaggccggc aaggccggat ccccgacct 360

cgacctctgg ctaataaagg aaatttatit tcatgtcaat agtgtgttgg aatittttgt 420

gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcggagat 480

ctctagctag aggatcgatc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc 540

cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttgttacaac ttgccaactg 600

ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aagggttct ctgactgtag 660

ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag 720

cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga 780

agctcttaca ccaatgctgg gggacatgta cctcccaggg gcccggaag actacgggag 840

gctacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg 900

gcattagcaa tagtgtttat aaggccccct tgtaaccct aaacgggtag catatgcttc 960

ccgggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttaccaacg 1020

ggaagcatat gctatcgaat taggttagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc 1080

caccccatga gcgtcacgg ttttatitac atggggtcag gattccacga gggtagtga 1140

ccattttagt cacaaggga gtggctgaag atcaaggagc gggcagtga ctctctga 1200

tcttcgcctg ctcttctatt ctctctctgt tagctaataa aataactgct gagtgtgaa 1260

cagtaagggt tatgtgaggt gctcgaaaac aagggttcag gtgacgccc cagaataaaa 1320

tttggacggg gggttcagtg gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcaaaaacc 1380

ccttgggcaa taaatactag ttaggaatg aaacattctg aatatcttta acaatagaaa 1440

tccatggggt ggggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta 1500

tgggcaacac ataactctag tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca 1560

gggaccaaga caggtgaacc atgttgttac actctatttg taacaagggg aaagagagtg 1620

gacgccgaca gcagcggact ccaactggtg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc 1680

tccacgcaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgtgg 1740

agtgggggca cgcgtcagcc cccacacgcc gcctgcggt tttggactgt aaaataaggg 1800

tgtataaact tggtgattg taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgccacaa 1860

aaccactaat ggcaccccg ggaatacctg cataagtagg tgggcgggcc aagatagggg 1920

cgcgattgct gcgatctgga ggacaaatta cacacacttg cgctgagcg ccaagcacag 1980

ggttgttgtt cctcatattc acgaggtcgc tgagagcacg gtgggctaata gttgccatgg 2040

glagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat cctaattctat atctgggtag 2100

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| cataggctat cctaattctat atctgggtag catatgctat cctaattctat atctgggtag | 2160 |
| tatatgctat cctaatttat atctgggtag cataggctat cctaattctat atctgggtag  | 2220 |
| catatgctat cctaattctat atctgggtag tatatgctat cctaattctgt atccgggtag | 2280 |
| catatgctat cctaatagag attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag   | 2340 |
| catatactac ccaaatatct ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata   | 2400 |
| tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata   | 2460 |
| tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata   | 2520 |
| ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata   | 2580 |
| tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaactg    | 2640 |
| agaattttct tgaagacgaa agggcctcgt gatagccta tttttatagg ttaatgtcat    | 2700 |
| gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc   | 2760 |
| tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg   | 2820 |
| ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc   | 2880 |
| ccttatctcc tttttgctgg cattttgctt tctgttttt gctcaccag aaacgtggt      | 2940 |
| gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgccagagtg gggtacatcg aactggatct   | 3000 |
| caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac    | 3060 |
| ttttaaggtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact  | 3120 |
| cggtcgcgcg atacactatt ctacagaatga ctgggttgag tactcaccag tcacagaaaa  | 3180 |
| gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga   | 3240 |
| taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt  | 3300 |
| tttgacaaac atgggggacg atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga   | 3360 |
| agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg   | 3420 |
| caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat  | 3480 |
| ggaggcggat aaagtgtcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat   | 3540 |
| tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc   | 3600 |
| agatggtgaag ccttcccgtg tcgtagttaa ctacacgacg gggagtcagg caactatgga  | 3660 |
| tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc   | 3720 |
| agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcatTTTT aatttaaaag  | 3780 |
| gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc   | 3840 |
| gttcactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt    | 3900 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt  | 3960 |
|                                                                    |      |
| gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat  | 4020 |
| accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc  | 4080 |
| accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa | 4140 |
| gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg  | 4200 |
| ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag  | 4260 |
| atactacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag    | 4320 |
| gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa  | 4380 |
|                                                                    |      |
| cgccctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt | 4440 |
| gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg  | 4500 |
| gttctcggcc ttttctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc   | 4560 |
| tgtggataac cgtattaccg cctttgagt agctgatacc gctcggcga gccgaacgac    | 4620 |
| cgagcgcagc gattcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct  | 4680 |
| ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc  | 4740 |
| gggcagttag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt  | 4800 |
|                                                                    |      |
| acactttatg cttccggctc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac  | 4860 |
| aggaaacagc tatgaccatg attacgcaa gctctagcta gaggtcagat ccctccccag   | 4920 |
| caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aacctagtc ccgccctaa    | 4980 |
| ctccgccat ccgcccccta actccgccca gtccgccca ttctccgcc catggtgac      | 5040 |
| taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt  | 5100 |
| agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct ttgcaaaaa gctttgcaa gatggataaa    | 5160 |
| gttttaaca gagaggaatc ttgacgcta atggacctc taggtcttga aaggagtggg     | 5220 |
|                                                                    |      |
| aattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt  | 5280 |
| ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga  | 5340 |
| aagtgatgct gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaa cgtatataag   | 5400 |
| tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt gccgccagaa cacagtaag   | 5460 |
| tgccgtgtgt ggttcccgcg ggccctggct ctttacgggt tatggcctt gcgtgccttg   | 5520 |
| aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg  | 5580 |
| gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccttcg cctcgtgctt gagttgaggc  | 5640 |

ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc 5700  
 tgctttcgaat aagctctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt 5760  
 ctggcaagat agtctttgtaa atgcggggcca agatctgcac actggtatctt cggttttttgg 5820  
 ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgctgc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct 5880  
 gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 5940  
 gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 6000  
 accagtgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg 6060

gaggacgcgg cgctcgggag agcggggcggg tgagtcaccc acacaaagga aaaggcctt 6120  
 tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct 6180  
 cgattagtgc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc 6240  
 gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat 6300  
 gtaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca 6360  
 gacagtgggt caaagttttt ttcttcatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc 6420  
 cctcgacctc gagatccatt gtgcccgggc gcacatgga catgcgcgtg cccgcccgag 6480

tgctgggcct gctgctgctg tggttccccg gctcgcgatg c 6521

<210> 80

<211> 6513

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 80

caacccaagg ctgccccctc ggtcactctg ttcccgcctt cctctgagga gcttcaagcc 60  
 aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc 120  
 tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa 180  
 agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc 240

cacagaagct acagctgccca ggtcacgcat gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc 300  
 cctacagaat gticagtgcg ggccgctcga ggccggcaag gccggatccc ccgacctcga 360  
 cctctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 420  
 tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggc cgagatccct cggagatctc 480  
 tagctagagg atcgatcccc gcccgggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc 540  
 ttcttcgcgg ggcagtgcac gtaatccctt cagttggttg gtacaacttg ccaactgggc 600

cctgttccac atgtgacacg ggggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgtagttg 660

acatccttat aaatggaigt gcacatttgc caacactgag tggctttcat cctggagcag 720

actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgtaactct tggctgaagc 780

tcttacacca atgctggggg acatgtacct ccagggggcc caggaagact acgggaggct 840

acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgta gctaccgata agcggaccct caagagggca 900

ttagcaatag tgittataag gcccccttgt taaccctaaa cgggtagcat atgcttcccg 960

ggtagtagta tatactatcc agactaacc taattcaata gcatatgtta cccaacggga 1020

agcatatgct atcgaattag ggtagtaaa agggtcctaa ggaacagcga tatctccac 1080

cccatgagct gtcacggttt tatttacaig gggtcaggat tccacgagg tagtgaacca 1140

ttttagtcac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct 1200

tcgctgctt cttcattctc ctctgtttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag 1260

taagggtgat gtgagggtct cgaaaacaag gtttcagggt acgccccag aataaaattt 1320

ggacgggggg ttcagtgggt gcattgtgct atgacaccaa tataaccctc acaaaccctt 1380

tgggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atctttaaca atagaaatcc 1440

atgggggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg 1500

gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tggggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg 1560

accaagacag gtgaaccatg ttgttacct ctatttgtaa caaggggaaa gagagtggac 1620

gccgacagca gcggactcca ctggtgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc 1680

acgccaatgg ggcccataaa caaagacaag tggccactct ttttttgaa attgtggagt 1740

gggggcacgc gtcagcccc acacgccgc ctgcggtttt ggactgtaaa ataagggtgt 1800

aataacttgg ctgattgtaa ccccgtaac cactgcggtc aaaccacttg cccacaaaac 1860

cactaatggc accccgggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag ataggggcgc 1920

gattgtgcg atctggagga caaattacac acacttgcgc ctgagcgcca agcacagggt 1980

tggttggtct catattcacg aggtcgctga gagcacggtg ggctaattgt gccatgggta 2040

gcataacta cccaaatatac tggatagcat atgctatcct aatctatac tgggtagcat 2100

aggctatcct aatctatac tgggtagcat atgctatcct aatctatac tgggtagtat 2160

atgctatcct aatttatac tgggtagcat aggctatcct aatctatac tgggtagcat 2220

atgctatcct aatctatac tgggtagtat atgctatcct aatctgtatc cgggtagcat 2280

atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatac tgggtagcat 2340

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| atactaccca aatatctgga tagcatatgc tatectaate tataatctggg tagcatatgc  | 2400 |
| tatectaate tataatctggg tagcataggc tatectaate tataatctggg tagcatatgc | 2460 |
| tatectaate tataatctggg tagtatatgc tatectaatt tataatctggg tagcataggc | 2520 |
| tatectaate tataatctggg tagcatatgc tatectaate tataatctggg tagtatatgc | 2580 |
| tatectaate tgtatccggg tagcatatgc tatectcatg ataagctgtc aaacatgaga   | 2640 |
| atcttcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttataggtta atgtcatgat   | 2700 |
| aataatgggt tcttagacgt caggtaggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat   | 2760 |
| ttgtttatct ttttaaatac attcaaatat gtatccgtc atgagacaat aaccctgata    | 2820 |
| aatgttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct    | 2880 |
| tattcccttt tttagcgcat tttagccttc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa    | 2940 |
| agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa   | 3000 |
| cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt   | 3060 |
| taaagtctg ctatgtggcg cggattatc cgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg      | 3120 |
| tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca    | 3180 |
| tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa    | 3240 |
| cactcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt    | 3300 |
| gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc   | 3360 |
| catacctaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaaca cgttcgcaa     | 3420 |
| actattaaat ggcaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga    | 3480 |
| ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggccct cggctggct ggtttattgc    | 3540 |
| tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga   | 3600 |
| tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga   | 3660 |
| acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga     | 3720 |
| ccaagttaac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catctttaat ttaaaaggat   | 3780 |
| ctaggtgaag atcctttttg ataactctat gacaaaaac cctaacgtg agttttcgtt     | 3840 |
| ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct    | 3900 |
| gcgcgtaate tgcgtctgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgttg tttgtttgcc     | 3960 |
| ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc   | 4020 |
| aaatactgtt ctcttagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc    | 4080 |
| gcctacatac ctgcctctgc taatcctgt accagtggct gctgccagt gcgataagtc     | 4140 |
| gtgtcttacc gggttgact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg     | 4200 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata  | 4260 |
| cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaaagg cggacaggta  | 4320 |
| tccggtaaagc ggcagggtcg gaacaggaga ggcacagagg gagcttccag ggggaaacgc | 4380 |
| ctggtatctt tatagtcccg tcgggttttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg | 4440 |
|                                                                    |      |
| atgctcgta gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcgcct ttttacggtt     | 4500 |
| cctggccttt tgcctgctt ttgctcacat gttcttctc gcgttatccc ctgattctgt    | 4560 |
| ggataaccgt attaccgct ttgagttagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga   | 4620 |
| gcgcagcgag tcagttagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc  | 4680 |
| cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg   | 4740 |
| cagttagcgc aacgcaatta atgtgagtt gctcactcat taggcacccc aggccttaca   | 4800 |
| ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg  | 4860 |
|                                                                    |      |
| aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtcgagtccc tccccagcag  | 4920 |
| gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc  | 4980 |
| cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccct ggctgactaa    | 5040 |
| ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt  | 5100 |
| gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt   | 5160 |
| ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatt gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat  | 5220 |
| tggctccgt gcccgctagt gggcagagcg cacatcgccc acagtcgccg agaagttggg   | 5280 |
|                                                                    |      |
| gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag  | 5340 |
| tgatgtcgt tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc   | 5400 |
| agtagtcgcc gtgaacgtt ttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaatgtc    | 5460 |
| cgtgtgtgt tcccggggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat    | 5520 |
| tacttcacc tggctgcagt acgtgattct tgatcccag cttcgggttg gaagtgggtg    | 5580 |
| ggagagttag aggccttgcg cttaaggagc cccttcgct cgtgcttgag ttgaggcctg   | 5640 |
| gcctggggcg tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgct gtctcgctgc   | 5700 |
|                                                                    |      |
| tttcgataag tctctagcca tttaaaatt ttgatgacct gctgcgacgc ttttttctg    | 5760 |
| gcaagatagt cttgtaaat ggggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc   | 5820 |
| cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca ggcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg   | 5880 |
| agcggggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctgtgtgc  | 5940 |
| tggcctcgcg ccgctgtga tcgccccgcc ctggggcgga aggttgcccc ggtcggcacc   | 6000 |
| agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct gcaggagct caaaatggag   | 6060 |

gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc 6120

gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 6180

ttagttctcg agcttttga gtacgtcgtc tttaggttgg ggggaggggt tttatcgat 6240

ggagtttccc cactctgagt ggggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 6300

attctccttg gaatttgcgc tttttgagtt tggatcttgg ttcattctca agcctcagac 6360

agtggttcaa agtttttttc ttccatttca ggtgtcgtga ggaattctct agagatccct 6420

cgacctcgag atccattgtg cccgggcgcc accatgactt ggacccact cctcttctc 6480

accctcctcc tccactgcac aggaagctta tcg 6513

<210> 81

<211> 6515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 81

acggttgctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac tttatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300

ttcaacaggg gagagtgttg agcgccgct cgaggccggc aaggccggat ccccgacct 360

cgacctctgg ctaataaagg aaatttatit tcatgtcaat agtgtgttgg aattttttgt 420

gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcggagat 480

ctctagctag aggatcgatc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc 540

cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttggtacaac ttgccaactg 600

ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aaggggttct ctgactgtag 660

ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggcttt catcctggag 720

cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggtgta 780

agctcttaca ccaatgtctg gggacatgta cctcccagg gcccaggaag actacgggag 840

gtacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg 900

gcattagcaa tagtgtttat aaggccccct tgtaaccct aaacgggtag catatgcttc 960

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ccgggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttaccaacg   | 1020 |
| ggaagcatat gctatcgaat tagggtagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc   | 1080 |
| caccccatga gctgtcacgg ttttatttac atggggtcag gattccacga gggtagtga   | 1140 |
|                                                                    |      |
| ccattttagt cacaagggca gtggctgaag atcaaggagc gggcagtga cttctctgaa   | 1200 |
| tcttcgctg cttcttcatt ctcttcgtt tagctaataa aataactgct gagttgtga     | 1260 |
| cagtaagggt tatgtgaggt gctcgaaaac aagggttcag gtgacgcccc cagaataaaa  | 1320 |
| tttggacggg gggttcagt gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcaaaacc    | 1380 |
| ccttgggcaa taaatactag ttaggaatg aaacattctg aatatcttta acaatagaaa   | 1440 |
| tccatggggt ggggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta  | 1500 |
| tgggcaacac ataactctag tgcaatatga tactggggtt attaagatgt gtcccaggca  | 1560 |
|                                                                    |      |
| gggaccaaga caggagaacc atgttgttac actctatttg taacaagggg aaagagagt   | 1620 |
| gacgccgaca gcagcggact ccactgggtg tctctaacac ccccgaaaat taaacggggc  | 1680 |
| tccacgcaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tctttttttt gaaattgtgg   | 1740 |
| agtgggggca cgcgtcagc cccacacgcc gcctgcggt tttggactgt aaaataagg     | 1800 |
| tgtataact tggtgattg taaccccgct aaccactgcg gtcaaaccac ttgccacaa     | 1860 |
| aaccactaat ggcaccccg ggaatactg cataagtagg tgggcgggcc aagatagggg    | 1920 |
| cgcgattgct gcgatctgga ggacaaatta cacacacttg gcctgagcg ccaagcacag   | 1980 |
|                                                                    |      |
| ggttgttgg cctcatattc acgaggtcgc tgagagcacg gtgggcta atgtgccatgg    | 2040 |
| gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat cctaacttat atctgggtag  | 2100 |
| cataggctat cctaacttat atctgggtag catatgctat cctaacttat atctgggtag  | 2160 |
| tatatgctat cctaatttat atctgggtag cataggctat cctaacttat atctgggtag  | 2220 |
| catatgctat cctaacttat atctgggtag tatatgctat cctaacttgt atccgggtag  | 2280 |
| catatgctat cctaataagag attagggtag tatatgctat cctaatttat atctgggtag | 2340 |
| catatactac ccaaatatct ggatagcata tgctatccta atctatatct gggtagcata  | 2400 |
|                                                                    |      |
| tgctatccta atctatatct gggtagcata ggctatccta atctatatct gggtagcata  | 2460 |
| tgctatccta atctatatct gggtagtata tgctatccta atttatatct gggtagcata  | 2520 |
| ggctatccta atctatatct gggtagcata tgctatccta atctatatct gggtagtata  | 2580 |
| tgctatccta atctgtatcc gggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaactg   | 2640 |
| agaattttct tgaagacgaa agggcctcgt gatagccta tttttatagg ttaatgtcat   | 2700 |
| gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc  | 2760 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg  | 2820 |
|                                                                    |      |
| ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc  | 2880 |
| ccttatcccc ttttttgcgg cattttgcct tctgtttttt gctcaccag aaacgtggt    | 2940 |
| gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct  | 3000 |
| caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac   | 3060 |
| ttttaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact   | 3120 |
| cggtcgccgc atacactatt ctcaaatga ctgtgttgag tactcaccag tcacagaaaa   | 3180 |
| gcactttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga  | 3240 |
|                                                                    |      |
| taaacctgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt | 3300 |
| tttgcaaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga   | 3360 |
| agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg  | 3420 |
| caaaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat  | 3480 |
| ggaggcggat aaagtgcag gaccacttct gcgtcggcc cttccggctg gctggtttat    | 3540 |
| tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag cactggggcc   | 3600 |
| agatggtaag cctccccga tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga   | 3660 |
|                                                                    |      |
| tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc  | 3720 |
| agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcatTTTT aatttaaaag  | 3780 |
| gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgacaaa atcccttaac gtgagttttc   | 3840 |
| gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctTTTT   | 3900 |
| tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt  | 3960 |
| gccggatcaa gagctacca cttttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat   | 4020 |
| accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttagccac cacttcaaga actctgtagc   | 4080 |
|                                                                    |      |
| accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa    | 4140 |
| gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg  | 4200 |
| ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag   | 4260 |
| atactacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag    | 4320 |
| gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa  | 4380 |
| cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt  | 4440 |
| gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg  | 4500 |

gttcctggcc ttttctggc cttttgtca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 4560  
 tgttgataac cgtattaccg cctttgagt agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 4620  
 cgagcgcagc gagtcatga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 4680  
 ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc 4740  
 gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggtttt 4800  
 acactttatg cttccggtc gtatgttgtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 4860  
 aggaaacagc tatgaccatg attacgcaa gctctagcta gaggtcgagt ccctcccag 4920

caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa 4980  
 ctccgcccat cccgcccta actccgcca gttccgcca ttctccgcc catggctgac 5040  
 taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 5100  
 agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gctttgcaa gatggataaa 5160  
 gttttaaaca gagaggaatc tttgcagcta atggacctc taggtcttga aaggagtggg 5220  
 aattggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt 5280  
 ggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga 5340

aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt ggggggagaac cgtatataag 5400  
 tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt gccgccagaa cacagtaag 5460  
 tgccgtgtgt ggttcccgcg ggcctggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg 5520  
 aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg 5580  
 gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccctcg cctcgtgctt gaggttaggc 5640  
 ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc 5700  
 tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctcgca cgctttttt 5760

ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggtatctt cggtttttgg 5820  
 ggcccgggcg ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgaca tgttcggcga ggcggggcct 5880  
 gcgagcgcg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 5940  
 gcctggcctc gcgcccgct gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 6000  
 accagttcgc tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg 6060  
 gaggacgagg cgctcgggag agcgggaggg tagtcaacc acacaaagga aaaggcctt 6120  
 tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct 6180

cgattagtct tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc 6240  
 gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat 6300  
 glaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttgatct tggttcattc tcaagcctca 6360

gacagtgggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc 6420  
cctcgacctc gagatccatt gtgcccgggc gcacatgac ttggaccca ctctcttcc 6480  
tcacctcct cctccactgc acaggaagct tatcg 6515

<210> 82

<211> 6519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 82

caaccaagg ctgccccctc ggtcactctg ttcccgcct cctctgagga gcttcaagcc 60  
aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc 120  
tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa 180  
agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc 240  
cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc 300  
cctacagaat gttcatgagc ggccgctcga ggccggcaag gccggatccc ccgacctcga 360

cctctggcta ataaaggaat tttatittca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 420  
tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggc cgagatccct cggagatctc 480  
tagctagagg atcgatcccc gccccggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc 540  
ttcttcgagg ggcagtgcgt gtaatccctt cagttgggtg gtacaacttg ccaactgggc 600  
cctgtttcac atgtgacacg gggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgtagtgt 660  
acatccttat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggctttcat cctggagcag 720  
actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgtaactct tggctgaagc 780

tcttacacca atgctggggg acatgtacct ccagggggcc caggaagact acgggaggct 840  
acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgta gctaccgata agcggaccct caagagggca 900  
ttagcaatag tgtttataag gcccccttgi taacctaaa cgggtlagcat atgcttcccg 960  
ggtagtagta tatactatcc agactaacc taattcaata gcatatgtta cccaacggga 1020  
agcatatgct atcgaattag ggtagtaaa agggctcctaa ggaacagcga tatctccac 1080  
cccatgagct gtcacgggtt tatttcatg gggtcaggat tccacgagg tagtgaacca 1140  
ttttagtac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct 1200

tcgcctgctt ctcatcttc cttcgttttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag 1260

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| taagggtgtat gtgagggtgct cgaaaacaag gtttcagggtg acgccccag aataaaattt | 1320 |
| ggacggggggg ttcagtgggtg gcattgtgct atgacaccaa tataaccctc acaaaccctt | 1380 |
| tgggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atctttaaca atagaaatcc   | 1440 |
| atgggggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg  | 1500 |
| gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tggggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg   | 1560 |
| accaagacag gtgaaccatg ttgttacact ctatttgtaa caaggggaaa gagagtggac   | 1620 |
|                                                                     |      |
| gccgacagca gcggactcca ctggttgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc   | 1680 |
| acgccaatgg ggcccataaa caaagacaag tggccactct ttttttgaa attgtggagt    | 1740 |
| gggggcacgc gtcagcccc acacccgcc ctgcggtttt ggactgtaaa ataagggtgt     | 1800 |
| aataacttgg ctgattgtaa ccccgctaac cactgcggtc aaaccacttg cccacaaaac   | 1860 |
| cactaatggc accccgggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag ataggggcgc   | 1920 |
| gattgtctcg atctggagga caaattacac acacttgcgc ctgagcgcca agcacagggt   | 1980 |
| tgttggctct catattcacg aggtcgctga gagcacggtg ggctaattgt gccatgggta   | 2040 |
|                                                                     |      |
| gcataacta cccaaatata tggatagcat atgctatcct aatctatac tgggtagcat     | 2100 |
| aggctatcct aatctatac tgggtagcat atgctatcct aatctatac tgggtagtat     | 2160 |
| atgctatcct aatttatac tgggtagcat aggctatcct aatctatac tgggtagcat     | 2220 |
| atgctatcct aatctatac tgggtagtat atgctatcct aatctgtatc cgggtagcat    | 2280 |
| atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatac tgggtagcat    | 2340 |
| atactacca aatatctgga tagcatatgc tatectaate tatatctggg tagcatatgc    | 2400 |
| tatectaate tatatctggg tagcataggc tatectaate tatatctggg tagcatatgc   | 2460 |
|                                                                     |      |
| tatectaate tatatctggg tagtatatgc tatectaatt tatatctggg tagcataggc   | 2520 |
| tatectaate tatatctggg tagcatatgc tatectaate tatatctggg tagtatatgc   | 2580 |
| tatectaate tglatccggg tagcatatgc tatectcatg ataagctgtc aaacatgaga   | 2640 |
| attttcttga agacgaaagg gcctctgat acgctatctt ttataggtta atgtcatgat    | 2700 |
| aataatgggt tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat   | 2760 |
| ttgtttattt ttctaaatac attcaaata gtatccgctc atgagacaat aaccctgata    | 2820 |
| aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct    | 2880 |
|                                                                     |      |
| tattcccttt ttigcggcat ttigccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa    | 2940 |
| agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa   | 3000 |
| cagcggtgaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt  | 3060 |
| taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg    | 3120 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tcgccgcata cactattctc agaatgacit ggittgagtac tcaccagtca cagaaaagca | 3180 |
| tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgt gccataacca tgagtataa    | 3240 |
| cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt  | 3300 |
| gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc  | 3360 |
| cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgcaa  | 3420 |
| actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga | 3480 |
| ggcggataaa gtgcaggac cacttctgcg ctccggccctt ccggttggtt ggttttattgc | 3540 |
| tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga  | 3600 |
| tggttaagccc tcccgatcgt tagttatctc cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga | 3660 |
| acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga    | 3720 |
| ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat  | 3780 |
| ctaggtgaag atcctttttg ataactctat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcgtt  | 3840 |
| ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttctt  | 3900 |
| gcgcgtaate tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc  | 3960 |
| ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc  | 4020 |
| aaatactgtt cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtaccacc   | 4080 |
| gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc  | 4140 |
| gigtcttacc gggttggact caagacgata gttaccgat aaggcgcagc ggtcgggctg   | 4200 |
| aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacacg aactgagata   | 4260 |
| cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta   | 4320 |
| tccggtaaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc  | 4380 |
| ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg  | 4440 |
| atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt  | 4500 |
| cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt  | 4560 |
| ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga  | 4620 |
| gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgaaac cgcctctccc   | 4680 |
| cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg  | 4740 |
| cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggcattaca  | 4800 |
| ctttatgctt ccggctcgtg tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg  | 4860 |
| aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctgctagag gtcgagtcce tccccagcag   | 4920 |

gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 4980

cgcccatccc gccctaact cgcgccagt cgcgccattc tccgccccat ggctgactaa 5040

ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt 5100

gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt 5160

ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatt gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat 5220

tggtccggt gccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtcccg agaagttggg 5280

gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag 5340

tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc 5400

agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggttaagtgc 5460

cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat 5520

tacttcacc tggctgcagt acgtgattct tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg 5580

ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg 5640

gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgtgc 5700

tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc ttttttctg 5760

gcaagatagt ctgtaaatg cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc 5820

cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg 5880

agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggia gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc 5940

tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggcctggccc ggtcggcacc 6000

agttgcgtga gcggaagat ggccgcttcc cggccctgct gcaggagct caaatggag 6060

gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc 6120

gtcctcagcc gtgccttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 6180

ttagtctcgc agcttttga gtacgtcgtc tttaggttgg ggggaggggt tttatcgat 6240

ggagtttccc cacttgagt ggggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 6300

attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg ttcattctca agcctcagac 6360

agtggttcaa agttttttc ttccatttca ggtgtcgtga ggaattctct agagatccct 6420

cgacctcag atccatttg cccgggcgcc accatggaca tgcgcgtgcc cgcccagctg 6480

ctgggcctgc tgcgtcgtg gtccccggc tcgcgatgc 6519

<210> 83

<211> 7185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide

<400> 83

```
gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgtcct acagtctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc cgtgcccag cacctgaagc cgcgggggga      360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatctc ccggaccct      420
```

```
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcttcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccacgcagaa aacctctcc      660
aaagccaaag ggagccccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgcgaggag      720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
```

```
ctggactccg acggctcctt cttctcttac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcaca cactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagcgccg ctcgaggccg gcaaggccgg      1020
atccccgac ctgcacctt ggctaataaa ggaaatttat ttctattgca atagtgtgtt      1080
ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttggtcgaga      1140
tccctcggag atctctagct agaggatcga tcccccccc ggacgaacta aacctgacta      1200
cgacatctct gcccttctt cgcggggcag tgcattgaat ccttcagtt ggttggtaca      1260
```

```
acttgccaac tgggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaagggtt      1320
ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca ttgccaaca ctgagtggct      1380
ttcatctgg agcagacttt gcagctctgt gactgcaaca caacattgcc ttatgtgta      1440
actcttggct gaagctctta caccaatgct gggggacatg tacctcccag gggcccagga      1500
agactacggg aggtacacc aacgtcaatc agaggggcct gtgtagctac cgataagcgg      1560
acctcaaga gggcattagc aatagtgttt ataaggcccc cttgttaacc ctaaacgggt      1620
```

agcatatgct tcccgggtag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata 1680

tgttacccaa cggaagcat atgctatcga attagggtta gtaaaagggt cctaaggaac 1740

agcgatatct cccaccccat gagctgtcac ggttttattt acatggggtc aggattccac 1800

gagggtagtg aaccatttta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcgggcagtg 1860

aactctcctg aatcttcgcc tgcctcttca ttctccttcg tttagctaata agaataactg 1920

ctgagttgtg aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaaa acaaggtttc aggtgacgcc 1980

cccagaataa aatttgacg ggggggttcag tggtaggcatt gtgctatgac accaatataa 2040

ccctcacaaa ccccttgggc aataaatact agttaggaa tgaaacattc tgaatatctt 2100

taacaataga aatccatggg gtggggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg 2160

aatttatggc tatgggcaac acataatcct agtgcaatat gatactgggg ttattaagat 2220

gtgtcccagg cagggaccaa gacaggtgaa ccatgttgtt acactctatt tgtaacaagg 2280

ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactggg tgtctctaac acccccgaac 2340

attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actctttttt 2400

ttgaaattgt ggagtggggg cagcgctcag cccccacag ccgcctgcg gttttggact 2460

glaaaataag ggtgtaataa cttagctgat tgtaaccccg ctaaccactg cggtaaac 2520

acttggccac aaaaccacta atggcacccc ggggaatacc tgcataagta ggtgggcggg 2580

ccaagatagg ggcgcgattg ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag 2640

cgccaagcac aggtttgttg gtccctatat tcacgaggtc gctgagagca cggtaggcta 2700

atgttgccat gggtagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaactt 2760

atatctgggt agcataggct atcctaactt atatctgggt agcatatgct atcctaactt 2820

atatctgggt agtatatgct atcctaattt atatctgggt agcataggct atcctaactt 2880

atatctgggt agcatatgct atcctaactt atatctgggt agtatatgct atcctaactt 2940

glatccgggt agcatatgct atcctaatag agattagggt agtatatgct atcctaattt 3000

atatctgggt agcatatact acccaaatat ctggatagca tatgctatcc taatctatat 3060

ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagca taggctatcc taatctatat 3120

ctgggtagca tatgctatcc taatctatat ctgggtagta tatgctatcc taatttatat 3180

ctgggtagca taggctatcc taatctatat ctgggtagca tatgctatcc taatctatat 3240

ctgggtagta tatgctatcc taatctgtat ccgggtagca tatgctatcc tcatgataag 3300

ctgtcaaaca tgagaatttt cttgaagacg aaaggcctc gtgatacgcc tatttttata 3360

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt | 3420 |
| gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag | 3480 |
| acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca | 3540 |
| tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcatthttgc cttcctgttt ttgctcacc | 3600 |
| agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat | 3660 |
| cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgcgccgaag aacgttttcc | 3720 |
| aatgatgagc acttttaag ttctgctaig tggcgcggtta ttatcccgtg ttgacgccgg | 3780 |
|                                                                   |      |
| gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc | 3840 |
| agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat  | 3900 |
| aacctgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga   | 3960 |
| gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc | 4020 |
| ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc | 4080 |
| aacaacgttg cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt  | 4140 |
| aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc  | 4200 |
|                                                                   |      |
| tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctcgcg gtatcattgc   | 4260 |
| agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca | 4320 |
| ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac tgattaagca  | 4380 |
| ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt  | 4440 |
| ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta | 4500 |
| acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg | 4560 |
| agatcctttt ttctgcgcg taatctgtg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc   | 4620 |
|                                                                   |      |
| ggtggtttgt ttgccgcatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag | 4680 |
| cagagcgcat ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa | 4740 |
| gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc | 4800 |
| cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc | 4860 |
| gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta | 4920 |
| caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaaag gccacgcttc ccgaaggag  | 4980 |
| aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct  | 5040 |
|                                                                   |      |
| tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttgccacc tctgacttga   | 5100 |
| gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc | 5160 |
| ggccttttta cggttcctgg ccttttctg gccttttct cacaatgtct ttcctgcgtt   | 5220 |

atccctgat tcgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 5280  
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg 5340  
caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc 5400  
cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc 5460

acccaggct ttacacttta tgcttcggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata 5520  
acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga 5580  
gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag 5640  
tccccccct aactccgcc atcccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc 5700  
cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc 5760  
tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctttgca 5820  
aagatggata aagttttaaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tctaggtctt 5880

gaaaggagt ggaattggct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cccccacagt 5940  
ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcg 6000  
ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg gtgggggaga 6060  
accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaaccgggt ttgccccag 6120  
aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccc cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc 6180  
ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg 6240  
ggttggaaagt ggggtgggaga gttcgaggcc ttgcgcttaa ggagccccct cgcctcgtgc 6300

ttgagttgag gcctggcctg ggcgctgggg ccgccgcgtg cgaatctggt ggcaccttcg 6360  
cgctgtctc gctgctttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgctgc 6420  
gacgtttttt tcttggaag atagtctgtt aaatcggggc caagatctgc aactggtat 6480  
ttcggttttt ggggcccggg gcggcgacgg ggcccgtgcg tcccagcgca catgttcggc 6540  
gaggcggggc ctgcgagcgc ggccaccgag aatcgacgg gggtagtctc aagctggccg 6600  
gcctgtcttg gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgcctggg cggaaggct 6660  
ggcccggctg gcaccagttg cgtgagcgga aagatggccg cttcccggcc ctgctgcagg 6720

gagctcaaaa tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg ggtgagtcac ccacacaaag 6780  
gaaaagggcc tttccgtcct cagccgtcgc ttcattgtac tccacggagt accgggcgcc 6840  
gtccaggcac ctgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtctttag gttgggggga 6900  
ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc 6960  
ttggcacttg atgtaattct ccttgggaatt tgccttttt gagtttggat cttggttcat 7020  
tctcaagcct cagacagttg ttcaaagttt tttcttcca tttcaggtgt cgtgaggaat 7080

tctctagaga tccctcgacc tcgagatcca ttgtgcccgg gcgccacat ggagtttggg 7140

ctgagctggc tttttcttgt cgcgatttta aaaggtgtcc agtgc 7185